

Série A, N° 1680.
N° d'ordre 2546.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ
DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Yves RAOUL

1^{re} THÈSE

1^{re} Thèse. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BIOCHIMIQUE DE
L'HORDÉNINE.

2^e Thèse. — LA PERMÉABILITÉ CELLULAIRE CHEZ LES VÉGÉTAUX.

Soutenues le 10 DEC 1936 1936 devant la Commission d'examen.

MM. G. BERTRAND.....	<i>Président.</i>
A. GUILLIERMOND	} <i>Examineurs.</i>
L. PLANTEFOL....	

RENNES
IMPRIMERIES OBERTHUR

1936

Série A, N° 1680.

N° d'ordre 2546.

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ
DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Yves RAOUL

1^{re} THÈSE

1^{re} Thèse. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BIOCHIMIQUE DE
L'HORDÉNINE.

2^e Thèse. — LA PERMÉABILITÉ CELLULAIRE CHEZ LES VÉGÉTAUX.

Soutenues le

1936 devant la Commission d'examen.

MM. G. BERTRAND..... *Président.*

A. GUILLIERMOND }
L. PLANTEFOL.... } *Examineurs.*



RENNES
IMPRIMERIES OBERTHUR

—
1936

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire..... M. MOLLIARD.
Doyen..... C. MAURAIN, Professeur, Physique du Globe.

Professeurs honoraires.	{	H. LEBESGUE.	GUILLET.	JANET.
		A. FERNBACH.	PÉCHARD.	LESPIEAU.
		A. LEDUC.	FREUNDLER.	MARCHIS.
		Émile PICARD.	AUGER.	VESSIOT.
		Rémy PERRIER.	BLAISE.	PORTIER.
		Léon BRILLOUIN.	DANGEARD.	

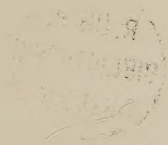
PROFESSEURS

G. BERTRAND....	T Chimie biologique.	F. PICARD.....	Zoologie (Évolution des êtres organisés).
M. CAULLERY....	T Zoologie (Évolution des êtres organisés)	Henri VILLAT....	T Mécanique des fluides et applications.
G. URBAIN.....	T Chimie générale.	Ch. JACOB.....	T Géologie.
Émile BOREL....	T Calcul des probabilités et Physique mathématique.	P. PASCAL.....	T Chimie minérale.
		M. FRÉCHET....	T Calcul différentiel et Calcul intégral.
Jean PERRIN....	T Chimie physique.	E. ESCLANGON....	T Astronomie.
H. ABRAHAM....	T Physique.	M ^{me} RAMART-LUCAS.	T Chimie organique.
E. CARTAN.....	T Géométrie supérieure.	H. BÉGHIN.....	T Mécanique physique et expérimentale.
M. MOLLIARD....	T Physiologie végétale.	Foch.....	Mécanique expérimentale des fluides.
L. LAPICQUE....	T Physiologie générale.	PAUTHENIER....	Physique (P. C. B.).
A. COTTON.....	T Recherches physiques.	De BROGLIE....	T Théories physiques.
J. DRACH.....	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	CHRÉTIEN.....	Optique appliquée.
Charles FABRY...	T Enseignement de Physique.	P. JOB.....	Chimie générale.
Charles PÉREZ...	T Zoologie.	LABROUSTE....	Physique du Globe.
Léon BERTRAND..	T Géologie structurale et Géologie appliquée.	PRENANT.....	Zoologie.
E. RABAUD.....	T Biologie expérimentale.	VILLEY.....	Mécanique physique et expérimentale.
M. GUICHARD....	Chimie minérale.	BOHN.....	Zoologie (P. C. B.).
Paul MONTEL....	T Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	COMBES.....	Botanique (P. C. B.).
P. WINTREBERT..	T Anatomie et Histologie comparées.	GARNIER.....	T Mathématiques générales.
L. BLARINGHEM..	T Botanique.	PÉRÈS.....	Mécanique théorique des fluides.
O. DUBOSCQ....	T Biologie maritime.	HACKSPILL....	Chimie (P. C. B.).
G. JULIA.....	T Mécanique analytique et Mécanique céleste.	LAUGIER.....	Physiologie générale.
C. MAUGUIN....	T Minéralogie.	TOUSSAINT....	Technique Aéronautique.
A. MICHEL-LÉVY.	T Pétrographie.	M. CURIE.....	Physique (P. C. B.).
H. BÉNARD.....	T Mécanique expérimentale des fluides.	G. RIBAUD....	T Hautes températures.
A. DENJOY.....	T Application de l'analyse à la Géométrie.	CHAZY.....	T Mécanique rationnelle.
L. LUTAUD.....	T Géographie physique et Géologie dynamique.	GAULT.....	Chimie (P. C. B.).
Eugène BLOCH...	T Physique théorique et Physique céleste.	CROZE.....	Recherches. Physiques.
G. BRUHAT.....	Physique.	DUPONT.....	T Théories chimiques.
E. DARMOIS....	Enseignement de physique.	LANQUINE....	Géologie.
A. DEBIERNE....	T Physique Générale et Radioactivité.	VALIRON.....	Mathématiques générales.
A. DUFOUR.....	T Physique (P. C. B.).	BARRABÉ.....	Géologie structurale et Géologie appliquée.
L. DUNOYER....	Optique appliquée.	MILLOT.....	Zoologie (P. C. B.).
A. GUILLIERMOND	T Botanique.	F. PERRIN....	Théories physiques.
M. JAVILLIER...	Chimie biologique.	VAVON.....	Chimie organique.
L. JOLEAUD....	Paléontologie.	G. DARMOIS....	Calcul des probabilités et Physique-Mathématique.
ROBERT-LÉVY...	Zoologie.		

Secrétaire..... A. PACAUD.
Secrétaire honoraire..... D. TOMBECK.



CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE BIOCHIMIQUE
DE L'HORDÉNINE



A MES PARENTS

A MON MAITRE

M. GABRIEL BERTRAND

MEMBRE DE L'INSTITUT

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

ANCIEN PRÉSIDENT DE L'ACADÉMIE D'AGRICULTURE

PROFESSEUR A LA SORBONNE ET A L'INSTITUT PASTEUR

avec l'expression de ma respectueuse reconnaissance.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION.....	11

HISTORIQUE

CHAPITRE I. — Rappel des principales théories sur l'origine et le rôle des alcaloïdes.....	17
CHAPITRE II. — Les touraillons. L'hordénine — Propriétés — Constitution — Synthèse.....	25

PREMIÈRE PARTIE

Essai de Phytosynthèse.

CHAPITRE I. — Passage de la tyrosine à l'hordénine.....	43
CHAPITRE II. — Passage de l'hordénine à la tyrosine.....	55

DEUXIÈME PARTIE

Techniques.

CHAPITRE I. — Dosage de l'hordénine.....	65
CHAPITRE II. — Dosage de la tyrosine.....	92
CHAPITRE III. — Dosage de l'azote protidique.....	112
CHAPITRE IV. — Technique microchimique.....	114

TROISIÈME PARTIE

Applications des techniques précédentes.

CHAPITRE I. — Répartition de l'hordénine dans les végétaux.	121
CHAPITRE II. — Essai d'analyse immédiate qualitative des radicelles de l'Orge.....	139
CHAPITRE III. — Évolution de l'hordénine dans l'Orge.....	145
CHAPITRE IV. — Évolution de la tyrosine au cours de la germination de l'Orge.....	165
CHAPITRE V. — Évolution de l'azote protidique au cours de la germination de l'Orge.....	169
CHAPITRE VI. — Expériences tendant à influer sur la formation de l'hordénine.....	175

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.....	186
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.....	193

INTRODUCTION

C'est un fait actuellement reconnu par tous que l'extrême complexité de la Biologie a rendu inévitable la fragmentation de cette science en une multitude de branches où s'exercent la science et l'habileté d'un nombre chaque jour accru de chercheurs. Devant l'éparpillement de tant de travaux particuliers, la nécessité de synthèses d'ensemble apparaît périodiquement nécessaire, ces dernières devenant d'ailleurs d'une réalisation de plus en plus difficile. Il serait cependant inexact de croire que si étroitement spécialisée que paraisse la solution d'un problème, il soit impossible d'en faire apparaître un aspect d'ordre général. De l'examen sommaire des travaux publiés en Chimie biologique, par exemple, on voit qu'une partie d'entre eux sont dominés par l'emploi d'une technique ; dans ce cas l'application de celle-ci à la solution du plus grand nombre possible de problèmes apporte ce caractère de généralité. D'autres travaux, au contraire, attachés à l'éclaircissement d'un point très particulier, utilisent les ressources de techniques variées ; l'élargissement de l'horizon du spécialiste résulte alors de la multiplicité des angles sous lesquels le problème est examiné. Le travail que nous présentons ici se rattache plutôt à ce second type.

L'origine, le devenir, le rôle des alcaloïdes ont constitué certainement l'un des chapitres de la Biochimie végétale les plus étudiés à la fin du siècle dernier et au commencement de celui-ci. Au début, une idée trop absolue de l'unité de ce groupe de substances incita les savants à la recherche de solutions très générales. Le nombre des alcaloïdes de constitution connue augmentant sans cesse, il apparut une telle diversité à l'intérieur du groupe qu'il fallut restreindre singulièrement l'extension des conclusions. On ne chercha plus à débrouiller l'origine ou le rôle *des* alcaloïdes, mais d'*un* alcaloïde ou tout au plus d'une famille homogène de ceux-ci.

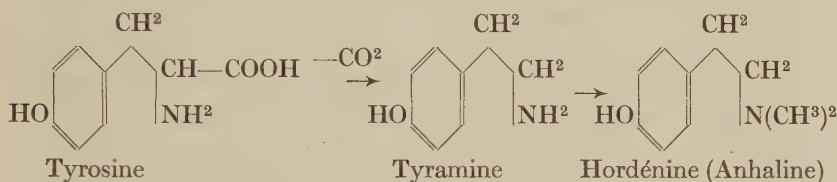
Parmi les théories généralement émises à ce sujet et dont nous faisons une revue rapide dans notre partie historique, celles se référant à l'analogie de constitution d'un certain nombre d'alcaloïdes avec quelques acides aminés naturels retiennent particulièrement l'attention. C'est pourquoi un très grand nombre de mémoires tentent d'établir entre les matières protidiques génératrices par hydrolyse d'acides aminés d'une part, et les alcaloïdes d'autre part, des relations basées sur l'examen des formules et plus rarement sur l'expérimentation. Pourtant M. Michel POLONOVSKI, dans une belle conférence faite en 1924 sur le mode de formation et le rôle des alcaloïdes dans la plante, note très justement qu'il faut faire « une distinction très nette entre l'analogie de constitution et l'idée de filiation ». Et M. Michel POLONOVSKI de s'appuyer sur un exemple que nous citons d'autant plus volontiers que celui-ci pose le problème dont nous recherchons la solution dans ce travail : « En effet, de ce que l'hordénine, par exemple, possède une formule très voisine de la tyrosine, nous ne sommes pas encore autorisés, *ipso facto*, à déduire que notre alcaloïde dérive de cet acide aminé. Ces deux composés pourraient fort bien provenir d'une formation parallèle et être, l'un comme l'autre, le résultat d'une synthèse primitive de la part de la plante ou, encore, l'un et l'autre des produits du métabolisme des protéiques ».

Cependant, cette « idée de filiation » n'en constitue pas moins une hypothèse de travail qui doit être utilisée d'autant plus que si, d'après le même auteur, « la preuve de l'origine protéique des alcaloïdes n'est pas encore apportée » (et ceci était encore vrai en 1932, date à laquelle nous avons entrepris nos recherches) la preuve du contraire ne l'est pas davantage. Nous ajouterons même que l'examen des possibilités d'une « formation parallèle » ne doit, à notre sens, logiquement intervenir qu'après celui des possibilités de la « filiation » et c'est pourquoi nous limitons notre étude à cette dernière alternative.

C'est un exemple souvent cité, jamais prouvé, de cette filiation éventuelle, que l'origine probable de l'hordénine, alcaloïde isolé par LÉGER, en 1906, des radicelles d'Orge, lesquelles desséchées constituent un sous-produit de la fabri-

cation du malt appelé « touraillons ». Cet alcaloïde existe aussi dans une Cactée du Mexique, l'*Anhalonium fissuratum* Engelm et est désigné alors sous le nom d'anhaline.

La formule de l'hordénine, ou anhaline, est celle de la tyrosine décarboxylée et diméthylée à l'azote. La tyrosine, uniquement décarboxylée, constitue la tyramine que l'on trouve dans l'Ergot de seigle. L'analogie des formules de ces trois substances : tyrosine, tyramine et hordénine n'a pas manqué d'être remarquée par de nombreux auteurs et l'on peut voir dans quelques traités de Biochimie le schéma suivant :

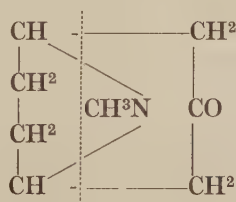


où les flèches volontairement placées indiquent, en plus de l'analogie, des relations d'origine possibles.

On pourrait assurément concevoir entre la tyrosine et l'hordénine d'autres intermédiaires, mais ce schéma présentant la plus grande simplicité, c'est à la recherche de son existence réelle dans la nature que nous consacrons ce travail.

Le problème étant ainsi posé au point de vue théorique, nous avons pensé qu'une étape intéressante, en quelque sorte intermédiaire entre cette pure conception de l'esprit qu'est le schéma précédent et la réalité de la matière vivante, serait l'examen des possibilités de ces transformations en s'inspirant des « modèles de phytosynthèse » *in vitro* imaginés par R. ROBINSON.

Chacun connaît la synthèse de la tropinone réalisée par ce savant (114).



La formule symétrique de ce corps peut être théoriquement décomposée suivant le pointillé de la figure précédente en radical aldéhyde succinique, acétone et méthylamine. Or, la condensation de ces trois substances fournit effectivement des traces de tropinone et de légères modifications permettent d'atteindre un rendement de 42 %. Cette synthèse, du simple point de vue industriel d'abord envisagé, présente d'immenses avantages sur celle extrêmement compliquée réalisée par WILLSTAETTER (140). La nature très simple des substances entrant en réaction, jointe aux conditions physiques de celles-ci (température, dilution) incite aussitôt ROBINSON à considérer que la plante utilise peut-être un procédé analogue pour effectuer cette synthèse (115). Puis, généralisant très hardiment ce principe, et en s'aidant de substances simples comme l'ammoniaque et l'aldéhyde formique, d'acides aminés, de produits de dégradation des sucres, il présente les synthèses théoriques d'un grand nombre d'alcaloïdes. Nous ne nous étendrons pas sur ces constructions quelque peu arbitraires, car s'il arrive à ROBINSON de rencontrer à certains stades des réactions effectivement réalisées en chimie organique, un grand nombre d'entre elles demeurent hypothétiques.

Par contre, en nous inspirant de l'idée de ces « modèles de Phytosynthèse », nous tentons de réaliser expérimentalement le passage de la tyrosine à l'hordénine par l'intermédiaire de la tyramine. Nos recherches analytiques nous montrant que l'hordénine disparaît après un mois de germination, le retour de l'hordénine à la tyrosine est essayé dans les mêmes conditions. L'ensemble de ces recherches de chimie organique constitue la première partie de notre thèse, dont l'exposé suit immédiatement les considérations historiques. Celles-ci comprennent un résumé des théories sur l'origine des alcaloïdes et une étude détaillée des travaux antérieurs concernant l'hordénine.

Reste la recherche biochimique proprement dite destinée à affirmer ou infirmer le bien-fondé du schéma théorique initial. Il nous apparaît qu'il faut connaître, en premier lieu, la répartition de l'hordénine dans le règne végétal, puis son évolution précise dans certains cas particuliers. Les dosages

simultanés de la tyrosine, de l'azote protidique nous sont également nécessaires. Les techniques existantes étant ou insuffisantes ou non adaptées aux conditions particulières de notre problème, nous groupons dans une deuxième partie toutes les questions de *technique*. Elles comprennent :

- a) la recherche et le dosage de l'hordénine;
- b) le dosage de la tyrosine;
- c) le dosage de l'azote protidique;
- d) la technique microchimique.

Cette dernière ne peut être laissée de côté en raison des services qu'elle rend dans l'étude *in situ* à l'échelle de la cellule vivante.

Enfin, *l'application* de ces techniques, application qui constitue la troisième partie de notre travail, nous conduit à faire remarquer qu'une bonne technique analytique ne suffit pas pour résoudre un problème. L'interprétation des nombres, et, en premier lieu la nature des grandeurs auxquelles on les rapporte, a une importance considérable. Ceci paraît évident et doit cependant être dit puisque, pour n'avoir pas tenu suffisamment compte de considérations de cet ordre, de nombreux auteurs ont fourni des résultats analytiques inutilisables. Nous montrons un exemple de ce fait au sujet de l'évolution de l'hordénine dans les radicules d'Orge au cours de la germination.

Le premier chapitre de cette troisième partie est consacré à la recherche de l'éventuelle diffusion de l'hordénine dans les plantes; il ne peut être naturellement question de passer en revue de nombreuses familles : nous nous limitons presque exclusivement à celle des Graminées en commençant par un examen des plantes les plus voisines de l'Orge.

La tyrosine et l'hordénine se trouvant dans cette plante, nous recherchons si le pivot supposé de la réaction conduisant de l'une à l'autre, la tyramine, se rencontre à côté de ces deux substances et si, par ailleurs, d'autres alcaloïdes de constitution plus ou moins voisine de celle de l'hordénine, peuvent être décelés. La question de la tyrosine libre retient aussi notre attention.

Enfin, l'évolution simultanée de l'hordénine, de la tyrosine et de l'azote protidique dans les radicules pendant la germi-

nation de l'Orge doit, dans notre esprit, fournir la réponse la plus nette à la question posée. En raison des résultats obtenus, nous tentons finalement de faire varier expérimentalement la formation de l'hordénine.

Nos conclusions et les considérations d'ordre général qu'elles suggèrent terminent l'exposé des présentes recherches.

*
* *

Nous ne voulons pas entrer plus avant dans l'exposé de ce travail sans présenter à M. Gabriel BERTRAND, Membre de l'Institut, Professeur à la Sorbonne, l'expression de nos très vifs remerciements pour nous avoir accepté dans son laboratoire, constamment conseillé dans nos recherches et pour avoir vérifié pas à pas les résultats obtenus; qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

Nous sommes heureux de l'occasion qui nous est offerte pour remercier également nos amis et collègues dont l'obligeance jamais démentie a toujours facilité notre tâche.

HISTORIQUE

CHAPITRE PREMIER

RAPPEL DES PRINCIPALES THÉORIES SUR L'ORIGINE ET LE RÔLE DES ALCALOÏDES

A. — ORIGINE DES ALCALOÏDES DANS LA PLANTE

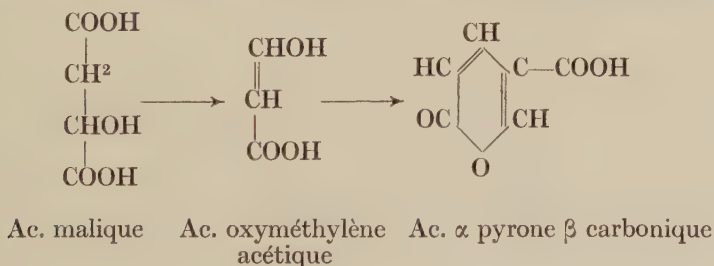
A ce sujet deux groupes de conceptions sont prises en considération :

- 1^o origine glucidique;
- 2^o origine protidique.

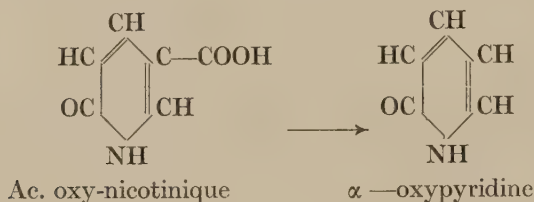
1^o ORIGINE GLUCIDIQUE

L'oxydation des glucides donne naissance à des acides organiques d'où l'on peut faire dériver certains alcaloïdes. D'après cette théorie, soutenue successivement par DUNSTAN (35) puis GADAMER (49), l'amidon et les sucres, en s'oxydant, conduisent aux acides malique, citrique, méconique, chélidonique, quinique, opianique, etc...

L'acide malique, par exemple, après décarboxylation et oxydation, peut donner l'acide oxyméthylène-acétique :



Ce dernier se cyclise par condensation de deux molécules en acide α pyrone β carbonique ou acide coumalique. Dans un troisième stade, la partie aminée de la molécule apparaît par action de l'ammoniaque avec formation d'acide oxynicotinique, lequel par décarboxylation conduit à l' α -oxypyridine :



De ce dernier corps on peut faire théoriquement dériver les alcaloïdes de la Ciguë et de la noix d'Arc.

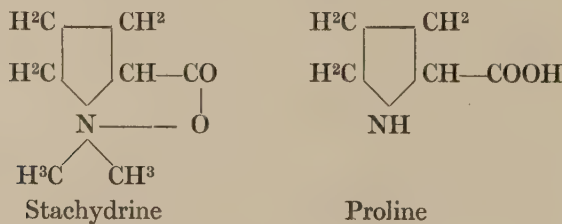
Par un mécanisme du même genre, l'acide quinique peut engendrer le noyau quinoléique.

Quoi qu'il en soit, cette théorie est bien moins souvent prise en considération que celle que nous allons exposer maintenant.

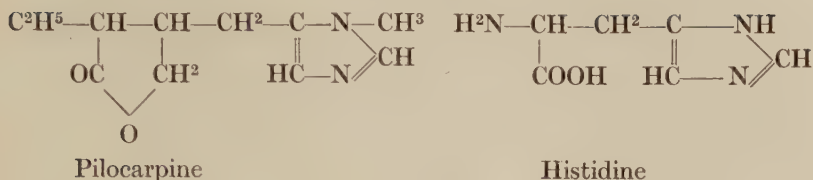
2° ORIGINE PROTIDIQUE

Cette théorie, nous l'avons vu, tire son origine de la comparaison des formules manifestement voisines de certains alcaloïdes et d'amino-acides naturels. PICTET (104) la soutint tout d'abord.

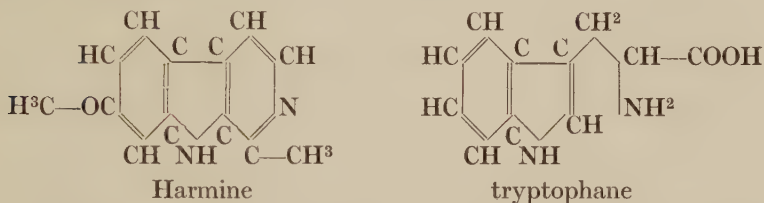
Nous n'insisterons pas sur l'analogie maintes fois signalée de la caféine, de la théobromine avec les produits de la dégradation purique des nucléoprotides. Signalons plutôt la parenté de la stachydrine avec la proline :



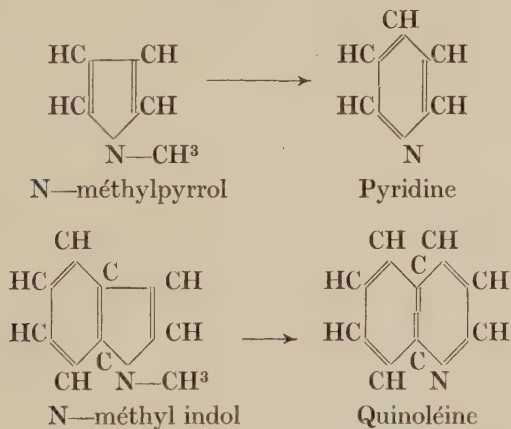
de la pilocarpine avec l'histidine :



ou de l'harmine avec le tryptophane :

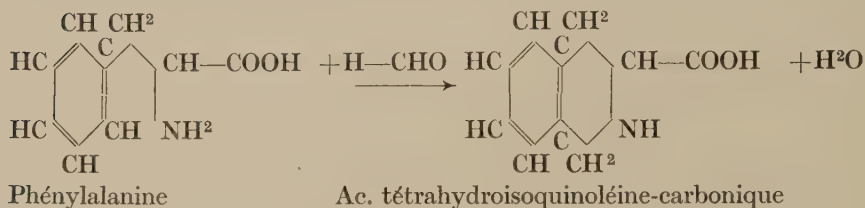


Pour les noyaux pyridique et quinoléique, fréquemment représentés chez les alcaloïdes, mais qui ne se rencontrent pas dans les acides aminés, PICTET signale que le chauffage prolongé au rouge sombre permet le passage du méthylpyrrol à la pyridine ou encore du N-méthyl indol à la quinoléine. Ces expériences permettent d'établir encore une filiation entre les deux catégories de substances :



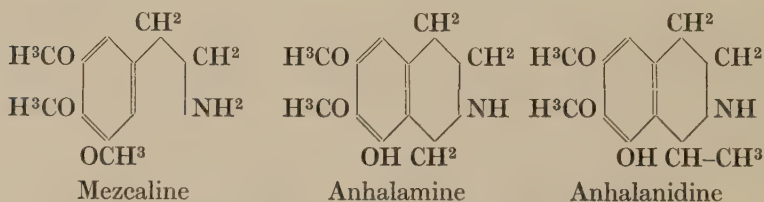
Nous avons déjà signalé dans notre introduction l'analogie des formules d'un amino-acide : la tyrosine, d'une amine : la tyramine et d'un alcaloïde : l'hordénine, puisqu'il

s'agit précisément du point de départ de nos recherches. Dans ce cas, PICTET (105) montre que l'on peut, en partant de substances à noyau phényléthylénique, passer au noyau isoquinoléique par condensation à l'aide de l'aldéhyde formique. Il obtient ainsi à partir de la phénylalanine un acide tétrahydroisoquinoléine-carbonique :

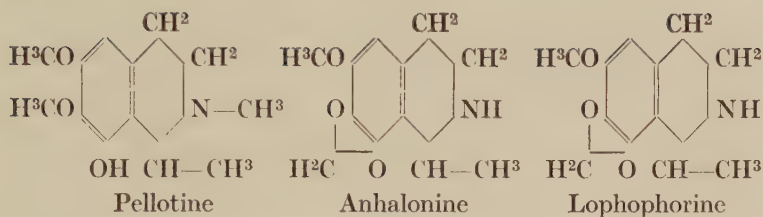


Cette condensation tire son intérêt de l'extrême fréquence du noyau isoquinoléique dans les alcaloïdes. L'émétine de l'Ipéca, certains alcaloïdes de l'opium, l'hydrastine, la berbérine, de nombreuses bases du genre *Anhalonium* appartiennent à ce groupe. Ces dernières doivent retenir ici notre attention. Nous avons vu, en effet, que l'hordénine se trouve dans une espèce du genre *Anhalonium*, l'*A. fissuratum* Engelm et qu'elle s'y rencontre seule. Dans deux genres voisins, l'*A. Williamsii* Salm-Dyck et l'*A. Lewinii* Hennings, au contraire, on a pu identifier six alcaloïdes dont les constitutions ont été établies grâce aux travaux de SPAETH et de ses collaborateurs (1).

Nous donnons ci-contre les formules développées de ces bases dont l'examen est à notre point de vue d'un grand intérêt :



(1) La drogue connue sous le nom de « Mescal buttons » est constituée en majeure partie de fragments desséchés des *Anhalonium Lewinii* Hennings et *Williamsii* Salm-Dyck ou « Peyotl ». Son ingestion à petites doses provoque entre autres symptômes l'apparition de visions colorées (118) attribuées à l'action de la mezcaline.



La mezcaline rappelle directement l'hordénine dont elle a la constitution oxyphényléthylamine. Tous les autres alcaloïdes possèdent le noyau isoquinoléique et il est remarquable de trouver ainsi côte à côte, dans la même plante, des substances dont la filiation s'établit si aisément à l'aide de la condensation avec l'aldéhyde formique, imaginée par PICTET. Notons, cette remarque devant nous servir par la suite, que ces corps, à l'exception de la pellotine, ne sont pas méthylés à l'azote comme l'est l'hordénine; presque toutes les fonctions phénoliques sont par contre éthérifiées par l'alcool méthylique et d'autres groupements méthyle se présentent sous forme de chaîne aliphatique.

Cette théorie d'apparence déjà si cohérente, permettant de relier les alcaloïdes aux protides, se complète encore par les possibilités de méthylation réalisables au moyen de la méthode d'oxydo-méthylation ou de méthylation simple à l'azote de K. HESS (69, 70, 71). L'aldéhyde formique, seul ou en présence d'acide formique, est l'agent de ces réactions. Cependant, WINTERSTEIN et TRIER (144) pensent que l'alcool méthylique serait plutôt le méthylant habituel.

Les exemples de biosynthèse de R. ROBINSON signalés dans l'introduction et où les substances de départ sont généralement plus simples que les acides aminés, ont parfois été cités à l'encontre de l'origine protidique des alcaloïdes. Le problème de la synthèse des amino-acides dans la plante restant entier, rien ne paraît empêcher de faire entrer ces acides aminés dans des modèles de phyto-synthèse si voisins que les notions distinctes de « filiation » et « formation parallèle » dont parle M. Michel POLONOVSKI perdent singulièrement de leur antagonisme.

A côté de ces recherches théoriques ou purement organiques, des expériences basées sur l'analyse biochimique ont

essayé de confirmer cette théorie. Avant de citer les principales d'entre elles, disons tout de suite qu'aucune n'est parvenue à trancher la question.

CIAMICIAN et RAVENNA (28), par exemple, injectent de la pyridine à des plants de Tabac et trouvent une augmentation, mais très faible, du taux de nicotine.

CLAUTRIAU (31) dose comparativement les alcaloïdes et matières protidiques des capsules de Pavot et montre qu'en comparant les quantités d'azote mises en œuvre aucune déduction valable ne peut être tirée. Lorsque l'azote alcaloïdique varie de 3 unités, l'azote protidique varie de 200. L'erreur relative sur le plus grand chiffre est supérieure à la valeur absolue du second...

WEEWERS (137) admettrait plutôt une petite variante de la théorie en question, selon laquelle l'alcaloïde ne serait qu'un produit *secondaire* du dédoublement des protéides. Il s'appuie sur le fait qu'à l'obscurité, la teneur en alcaloïde des feuilles de Thé, de Quinquina ou de Café augmente tandis que baisse celle des matières protéidiques.

Enfin J. CHAZE (26) montre que dès l'imbibition des grains d'aleurone, imbibition à l'origine des jeunes vacuoles, il est possible de faire apparaître des précipitations dues à la nicotine.

En résumé, un très grand nombre de considérations théoriques ou basées sur l'expérience autorisent un rapprochement entre alcaloïdes et matières protidiques. En admettant avec M. Michel POLONOVSKI qu'une « idée de filiation » ne doive pas forcément être retenue, le parallélisme de certains processus synthétiques communs à ces deux classes de substances, joint à des passages reconnus possibles de l'une de ces classes à l'autre, justifient l'hypothèse de travail de laquelle nous partons.

B. — RÔLE DES ALCALOÏDES DANS LA PLANTE

La question ainsi présentée nous paraît mal posée car du jour où l'origine et le devenir des alcaloïdes seront définitivement éclaircis, leur rôle sera par là-même connu.

Certains, à la suite d'ERRERA, et en exagérant beaucoup les conclusions de cet auteur, ont cru voir dans les alcaloïdes des substances toxiques susceptibles de *protéger* les plantes qui les renferment contre les animaux. Cette assertion ne résiste pas au moindre examen. Ne voit-on pas certains animaux rechercher des plantes alcaloïdifères dangereuses uniquement *pour l'homme*? Il s'agit donc là d'un point de vue finaliste, anthropocentrique surtout, depuis longtemps rejeté.

HECKEL et BARTHE (63) tirent de la présence des alcaloïdes dans des régions de la plante où l'activité cellulaire est grande, une preuve d'un *rôle de réserve* de ceux-ci. Cet argument, comme l'a montré M. A. GORIS (53), prouve aussi bien — ou aussi mal — en faveur de la théorie de l'alcaloïde, substance de déchet, que nous examinons plus loin. Les expériences de nutrition des végétaux au moyen d'alcaloïdes ne donnent par ailleurs que des résultats contradictoires. Si un alcaloïde peut dans quelques cas particuliers servir d'aliment azoté, ce n'est qu'en très petite proportion. Nous reviendrons sur ce point dans les considérations générales qui suivent nos conclusions, notre travail nous amenant à envisager un autre aspect de cette question.

A la suite de CLAUTRIAU, de PICTET, l'alcaloïde, *substance de déchet*, constitue une théorie ralliant la plupart des physiologistes. La présence d'alcaloïdes dans les régions externes (écorces, feuilles) et dans des organes sécréteurs, le départ de nicotine par transpiration de plants de Tabac observé par J. CHAZE, plaident en faveur de cette hypothèse. Dans le même sens interviennent les expériences de CLAUTRIAU (32) dans lesquelles la caféine de graines de Caféier passe dans l'eau du milieu où elles sont mises à germer. Par contre, l'argument invoqué par PICTET selon lequel la méthylation fréquemment très poussée des alcaloïdes en diminue la toxicité pour la plante n'a pu être vérifiée. CIAMICIAN et RAVENNA (29) montrent au contraire que les groupements OH et NH deviennent de plus en plus toxiques lorsqu'on les méthyle progressivement.

Enfin, quatrième hypothèse due à CIAMICIAN et RAVENNA (30) les alcaloïdes peuvent être comparés *aux hormones* du

règne animal. Indépendamment de certaines analogies de constitution chimique, la localisation de quelques alcaloïdes dans des parties différenciées en vue de la reproduction (graines) ou encore dans des tissus en voie de régénération (expériences d'annélation de CLAUTRIAU), semblent à M. POLONOVSKI de solides raisons appuyant ce point de vue. Cependant, lorsque cet auteur déclare : « Le problème est-il réellement élucidé ou seulement transposé? », nous pensons que cette deuxième alternative est bien probable sans pour cela que de telles transpositions ne soient souvent utiles à l'avancement d'une question.

CHAPITRE II

LES TOURAILLONS — L'HORDÉNINE PROPRIÉTÉS — CONSTITUTION — SYNTHÈSE

LES TOURAILLONS

Le malt, employé dans la fabrication de la bière, est constitué par le grain d'Orge ayant subi un début de germination et privé de la jeune plantule après dessiccation. En raison de la faible durée de la germination (une semaine environ), la plantule se réduit à un faisceau de radicules, la tigelle demeurant encore invisible sous le péricarpe et les balles. Après dessiccation dans des fours appelés tourailles, ces radicules sont facilement détachées et constituent les *touraillons*.

On tenta d'utiliser ce sous-produit encombrant de la fabrication du malt sous forme d'engrais en raison de sa haute teneur en azote. Par ailleurs, il se révéla souvent toxique pour les animaux auxquels il fut donné mélangé au fourrage. Enfin, une quantité évidemment très faible de ce produit sert dans les laboratoires de bactériologie à la culture de quelques espèces microbiennes. C'est en utilisant les touraillons dans ce but que Roux (119), de Lyon, remarqua que le vibrion cholérique ne se développait pas dans une macération à 5 % de touraillons dans l'eau. Cette remarque servit de point de départ à quelques applications thérapeutiques de bouillons de ces germes contre la dysenterie et les affections cholériformes. Les résultats d'une telle thérapeutique s'étant révélés des plus aléatoires, la méthode fut rapidement abandonnée (17), (43), (78).

Cependant, LAUTH, de Carcassonne, envoya à E. LÉGER, des touraillons afin de rechercher si les propriétés de la drogue n'étaient pas dues à quelque principe chimique. Ce travail, entrepris quelques années plus tard, amena la découverte d'un alcaloïde nouveau l'*hordénine*. Les seules investigations chimiques antérieures, dans les touraillons, sont celles de J. C. LERMER (90) signalant la présence d'acides organiques, substances amères et asparagine, puis de E. SCHULZE (121) qui isola la choline et la bétaine mais ne put retrouver l'arginine, ni l'asparagine.

L'HORDÉNINE — PROPRIÉTÉS

L'hordénine est donc l'alcaloïde extrait des radicelles d'Orge ou touraillons par E. LÉGER (84), en 1906. Douze ans plus tôt, HEFFTER (64) avait isolé ce même corps, d'une Cactée du Mexique, l'*Anhalonium fissuratum* Engelm, d'où le nom d'*anhaline* qu'il lui avait donné. La formule attribuée à l'anhaline était $C^{10}H^{13}NO$ et le point de fusion $+ 115^{\circ} C$. Cette formule et ce point de fusion se retrouvent dans différents ouvrages de cette époque. Dans le traité intitulé « Constitution chimique des alcaloïdes végétaux » de A. PICTET (1897), l'anhaline figure avec la formule $C^{10}H^{13}NO_2$ qui lui confère un atome d'oxygène supplémentaire.

L'hordénine de LÉGER de formule $C^{10}H^{15}NO$ fondant à $+ 117^{\circ}8 C$. était si proche de l'anhaline de HEFFTER que le rapprochement des deux alcaloïdes, s'il avait été réalisé alors, aurait certainement fait naître un doute sur leur existence distincte. Ce n'est qu'en 1919 que SPAETH (123), au cours de travaux sur la synthèse de l'hordénine, montra l'identité de cet alcaloïde avec l'anhaline.

PROPRIÉTÉS PHYSIQUES

Obtenue par refroidissement d'une solution alcoolique saturée à chaud, l'hordénine cristallise sous forme de grands prismes opaques tandis que l'évaporation spontanée conduit à des cristaux transparents (84). A partir d'une solution aqueuse les cristaux obtenus sont anhydres. Ceux-ci, d'après

WYROUBOFF, sont des prismes orthorhombiques à forte biréfringence.

Point de fusion : + 117°8 C. (corr.).

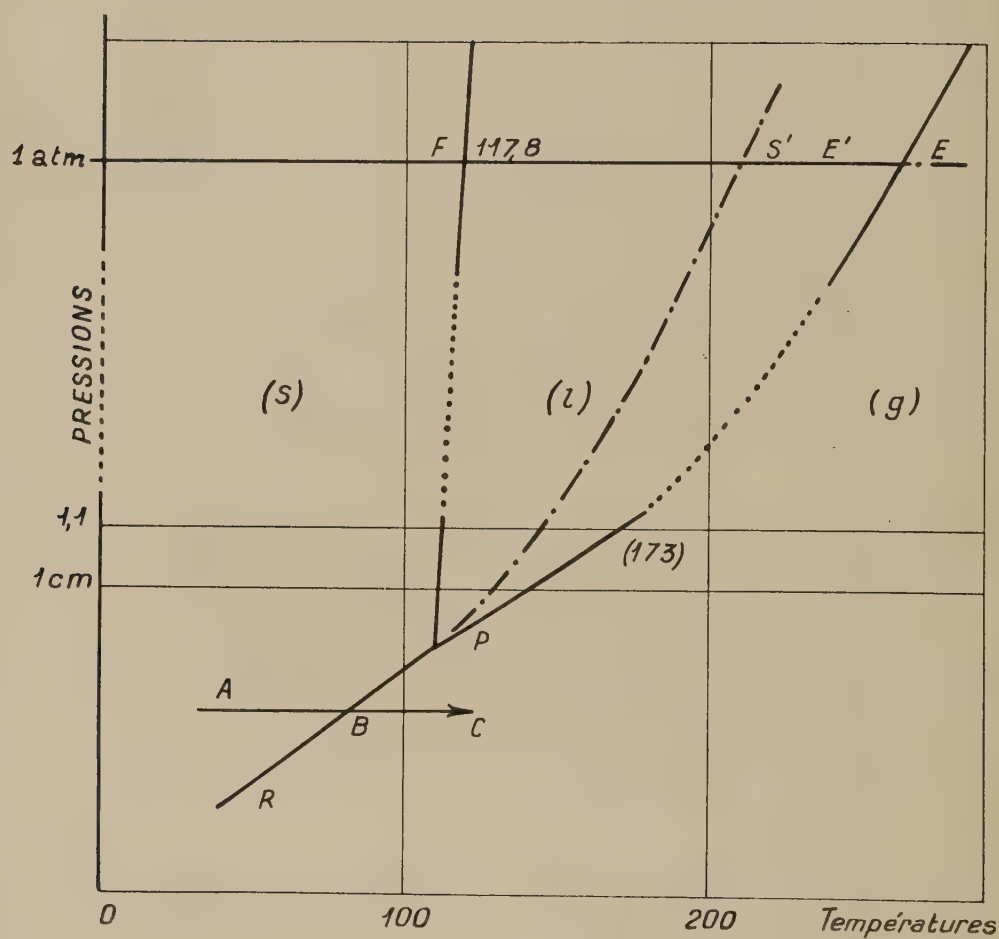
Maintenue à la température de fusion, l'hordénine se volatilise lentement et se condense directement sous la forme solide. Ce caractère fait écrire à E. LÉGER que l'on peut la sublimer « à la façon du camphre ». Il ne s'agit pas à proprement parler d'une sublimation puisque le corps passe par l'état liquide entre les phases solide et vapeur, mais le retour direct à l'état solide montre que l'hordénine présente facilement des points d'équilibre instable solide-vapeur dans le domaine de stabilité normal du liquide.

Le diagramme d'état de l'hordénine n'ayant pas été établi, nous nous sommes contenté de représenter (graphique 1) un schéma permettant la compréhension des phénomènes que nous avons personnellement observés, la distillation de l'alcaloïde dans certaines conditions, nous servant à sa purification (Voir II^e partie, chapitre 1, dosage de l'hordénine).

Ainsi par chauffage, sous la pression ordinaire, l'hordénine fond à + 117°8 C. (point F sur la courbe d'équilibre solide-liquide). A cette température la tension de vapeur est encore faible; si l'on chauffe vers 140-150°, la volatilisation devient notable, mais on ne peut atteindre le point d'ébullition (E, sur la courbe d'équilibre liquide-vapeur) sans décomposition. La vapeur émise en E' (température inférieure à l'ébullition), par exemple, donne par refroidissement *directement* le solide au point S' situé sur le prolongement de la courbe de sublimation RP.

Sous une pression réduite à 11 mm. de Hg, la température d'ébullition alors mesurable, est de 173-174° C. (R. SEKA 122).

Si l'on diminue encore la pression au voisinage de 1 mm. de mercure, le solide, dès 80°, émet une vapeur qui se condense — toujours sous la forme solide — sur les parois froides. Ces phénomènes étant observés dans le milieu hétérogène que constitue tout appareil de sublimation d'une part, et ne connaissant pas les coordonnées exactes du point triple d'autre part, nous ne pouvons affirmer si nous avons affaire



Graphique I.

Diagramme d'état schématique de l'hordénine.

à une *véritable* sublimation A-B-C (comme dans le cas du camphre sous la pression ordinaire par exemple) ou à une sublimation *apparente* telle que l'iode en fournit l'exemple classique.

L'hordénine se dissout facilement dans l'alcool, le chloroforme et l'éther. Elle est moins soluble dans le benzène et presque insoluble à froid dans l'éther de pétrole. (Notons à ce sujet que l'anhaline, d'après HEFFTER, était aussi soluble dans ce dernier solvant que dans l'alcool, le chloroforme, etc...). Il existe une grande différence de solubilité à chaud et à froid dans le tétrachlorure de carbone, ce qui permet une cristallisation abondante par refroidissement.

La solubilité dans l'eau, qui nous intéresse particulièrement pour la détermination des coefficients de partage de l'alcaloïde entre ce solvant et d'autres liquides non miscibles, est mentionnée de façon très différente suivant les auteurs : LÉGER considère l'hordénine comme « peu soluble dans l'eau » ; Torquato TORQUATI (134) écrit « moyennement soluble » tandis que SEKA (122) dit « très soluble dans l'eau, l'alcool, etc... ». Pour éclaircir ce point, nous avons déterminé la solubilité dans l'eau d'une hordénine préparée par nous et purifiée au moyen de plusieurs sublimations sous pression réduite. La moyenne de nos déterminations est de 7 mg par cm³, soit 7 ‰. Ce chiffre constitue pour un alcaloïde une solubilité dans l'eau non négligeable et qui a entraîné quelque difficulté dans l'établissement de notre technique de dosage.

Enfin, dernière propriété physique à noter, la courbe d'absorption dans l'ultra-violet a été établie par E. ABDERHALDEN et E. ROSSNER (1).

PROPRIÉTÉS CHIMIQUES

L'hordénine est une base tertiaire et comme telle possède une réaction alcaline : elle fait virer au bleu le papier rouge de tournesol, rougit la phénolphtaléine et déplace, même à froid, l'ammoniac de ses sels.

Sa basicité est atténuée par le caractère acide que lui confère une fonction phénolique. Elle peut se combiner aux alcalis caustiques : soude, potasse, d'où sa stabilité même à

chaud vis-à-vis de ces réactifs. Un courant de gaz carbonique libère l'hordénine de ces dernières combinaisons.

L'hordénine possède de plus des propriétés réductrices; elle réduit à froid le permanganate de potassium en solution acide et, à chaud, le nitrate d'argent ammoniacal et l'acide iodique.

Parmi les *réactifs généraux des alcaloïdes*, l'acide picrique et le tannin ne donnent en présence d'une solution aqueuse d'un sel d'hordénine qu'un louche peu caractéristique. Par contre, le réactif à l'iodo-bismuthate de potassium de DRAGENDORFF ou celui iodo-ioduré de BOUCHARDAT fournissent des précipités d'abord amorphes qui se transforment par cristallisation en petits paquets de fines aiguilles enchevêtrées. Récemment, JANOT et FAUDEMAY (75) ont étudié la précipitation de l'hordénine par l'acide silicotungstique (réactif de G. BERTRAND). Le silicotungstate cristallin qui se forme est de couleur jaune chamois.

Se rattachant aux propriétés de la partie *diméthyl-azotée* de la molécule, l'hordénine en solution diluée provoque l'apparition des « cristaux de FLORENCE », par addition d'un réactif iodo-ioduré (G. DENIGÈS, 33), comme le fait la triméthylamine ou la choline. Il suffit de déposer sur une lamelle une goutte d'une solution suffisamment diluée (2 ‰) de sulfate d'hordénine et d'ajouter une goutte du réactif suivant :

Iode.....	6 g.
IK.....	8 g.
H ² O.....	150 g.

Après avoir recouvert d'une lamelle, on voit apparaître sous le microscope des cristaux jaune-brun formés de tables ou d'aiguilles isolées ou associées en mâcles.

Due également au caractère amine tertiaire, signalons l'action de l'acide ferrocyanhydrique donnant avec une molécule d'hordénine un ferrocyanhydrate insoluble (50).

Les réactions imputables à la *fonction phénolique* de l'hordénine, que nous décrivons maintenant, doivent leur caractère particulier à la présence, dans la molécule, d'une chaîne latérale située en *para* par rapport à l'oxhydrile

phénolique; elles se ramènent donc aux réactions caractéristiques du plus simple des corps de ce type, le paracrésol.

Une réaction de condensation avec les *aldéhydes* est réalisable au moyen de l'acide sulfurique formolé : si à 2 cm³ d'une solution de sulfate d'hordénine (représentant 1 ou 2 cg de base), on ajoute 2 gouttes de formol, puis 1,5 à 2 cm³ de SO⁴H² pur et que l'on chauffe quelques instants, il apparaît une belle coloration vert émeraude. Cette réaction se fait plus aisément si l'on remplace le formol par une solution d'hexaméthylène-tétramine (urotropine), laquelle en milieu acide dégage l'aldéhyde formique nécessaire à la réaction (LABAT, 82). Nous avons reconnu que la coloration étant très stable et de plus proportionnelle à la quantité d'hordénine, elle pourrait au besoin servir au dosage de cette substance à l'état de pureté. La réaction précédente n'est autre que la condensation du paracrésol avec l'aldéhyde le plus simple de la série grasse; avec le second terme, l'aldéhyde acétique, ou l'un de ses polymères, la « paral-déhyde », on obtient dans les mêmes conditions une coloration groseille.

L'eau de chlore est un oxydant qui, en série aromatique, conduit fréquemment à des réactions colorées; dans le cas de la tyrosine, on obtient une coloration rouge virant au jaune. Si à une solution d'hordénine à 1 %, on ajoute 5 à 6 cm³ d'eau de chlore puis 8 gouttes d'ammoniaque, il apparaît une coloration jaune.

L'hordénine, comme tous les monophénols, donne avec le *réactif de Millon* une coloration rouge identique à celle fournie par la tyrosine, coloration fréquemment utilisée pour le dosage de cet acide aminé.

Un certain nombre de *sels* et de *dérivés* de l'hordénine ont été préparés par LÉGER (89) citons :

Le sulfate (C¹⁰H¹⁵NO)² SO⁴H² + H²O — soluble dans l'eau, très peu dans l'alcool à 95°;

Le chlorhydrate, anhydre;

Le bromhydrate, anhydre — très soluble dans l'eau;

L'iodhydrate;

Le tartrate neutre (C¹⁰H¹⁵NO)², C⁴H⁶O⁶, anhydre — très soluble dans l'eau;

Le tartrate acide $C^{10}H^{15}NO$, $C^4H^6O^6$.

Un dérivé *alcoylé*, l'iodométhylate $C^{10}H^{15}NO$, CH^3I s'obtient par chauffage en présence d'iodure de méthyle, en tube scellé à $+ 110^{\circ}$ C. ou en ajoutant à froid de l'iodure de méthyle à une solution éthérée ou alcoolique de la base. Il y a fixation d'un seul groupement ICH^3 ; l'hordénine est donc une base tertiaire.

Autres dérivés alcoylés : le chlorométhylate d'hordénine : $C^{10}H^{15}NO$, CH^3Cl obtenu en traitant par CH^3Cl une solution méthylique d'hordénine. Le chloro-éthylate, le bromo-éthylate et l'iodoéthylate sont également connus.

On obtient un dérivé acidylé, l'acétylhordénine, en chauffant 3 à 4 heures à $+ 100^{\circ}$ la base en présence d'un excès d'anhydride acétique, excès que l'on détruit ultérieurement par l'eau; on alcalinise par l'ammoniaque et épuise au moyen d'éther. L'acétylhordénine est incristallisable (seul l'iodhydrate cristallise). Par oxydation de ce corps il se forme de l'acide acétylparaoxybenzoïque.

Les éther-sels de la fonction *phénol* se préparent en ajoutant à la solution d'hordénine dans la pyridine le chlorure d'acide correspondant. Après 12 heures, on alcalinise par l'ammoniaque et reprend par l'éther. Le chlorhydrate de benzoylhordénine $C^{10}H^{14}$ (C^7H^5O) NO , ClH est un corps anhydre très soluble dans l'eau, beaucoup moins dans l'alcool. Sont également connus : le bromhydrate de benzoylhordénine, la cinnamylhordénine (dont le nitrate est très peu soluble), le chlorhydrate de cinnamylhordénine et le chlorhydrate d'anisylhordénine.

L'iodométhylate d'hordénine, que nous avons vu plus haut, traité par le sulfate de méthyle et la soude, conduit à l'iodométhylate de méthylhordénine, dérivé à la fois de la fonction amine et de la fonction phénol de l'hordénine.

CONSTITUTION DE L'HORDÉNINE

Elle fut établie définitivement par LÉGER dès 1907 (86).

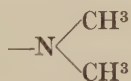
La formule brute de l'hordénine $C^{10}H^{15}NO$ en fait un isomère des éphédrines.

La présence d'un *atome d'azote tertiaire* est démontrée tout d'abord par la précipitation du corps à l'aide des réactifs généraux des alcaloïdes et aussi par la fixation d'une seule molécule d'iodure de méthyle que nous avons vue plus haut. Ainsi se manifeste une première différenciation par rapport aux éphédriques, bases secondaires.

Le *caractère phénolique* de l'hordénine est mis en évidence par la solubilité de l'alcaloïde dans les alcalis caustiques et aussi par la faible coloration violet-bleu qu'elle donne avec le perchlorure de fer.

Action des *réactifs oxydants* : l'acide azotique, en agissant sur l'hordénine, produit de l'acide picrique accompagné de traces d'acide oxalique d'où l'on déduit la présence d'un noyau benzénique possédant un oxhydrile en *para* par rapport à une chaîne latérale. A froid, le permanganate de potassium oxyde l'hordénine à fond en donnant uniquement de l'acide oxalique. Avec l'acétylhordénine, à 60°, l'oxydation est poussée moins loin et l'on obtient un acide cristallisable identifié avec l'acide acétylparaoxybenzoïque.

Pour élucider la constitution de la *chaîne latérale*, LÉGER prépare l'iodométhylate de méthylhordénine, dérivé à la fois des fonctions amine et phénol dont nous avons vu la préparation au cours de l'étude des dérivés de l'hordénine. Ce corps, traité par l'oxyde d'argent humide, échange l'iode contre un oxhydrile. Le méthylhydrate ainsi formé, fournit sous l'action de la chaleur de la triméthylamine et le paraviny-lanisol. La formation de triméthylamine prouve l'existence de 2 — CH³ liés directement à l'azote :



D'ailleurs si l'azote faisait partie du noyau, l'oxydation donnerait des bases pyridiques.

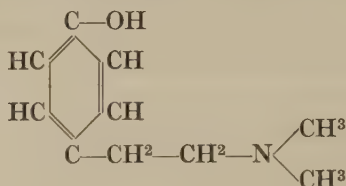
D'autre part, le radical vinyle-CH = CH² du paraviny-lanisol prouve l'existence d'une chaîne — CH² — CH² —.

On ne peut avoir : $\text{—N} \begin{cases} \text{CH}^2\text{—CH}^3 \\ \text{CH}^3 \end{cases}$, car dans ce cas, on

obtiendrait non la triméthylamine mais l'éthyldiméthylamine

et, dernière possibilité, l'existence d'un groupement méthyle directement lié au noyau doit être abandonnée puisque l'oxydation nitrique donne l'acide picrique et non un homologue.

La seule formule possible pour l'hordénine est donc celle d'une *para*oxyphényléthyldiméthylamine :



Cette formule ne comporte aucun atome de carbone asymétrique, en accord avec le fait que l'hordénine ne possède pas de pouvoir rotatoire.

Les synthèses de l'hordénine que nous allons examiner maintenant ont confirmé la formule spatiale précédente (1).

SYNTHÈSES DE L'HORDÉNINE

Elles étaient, avant celle personnelle que nous décrivons plus loin, au nombre de six; nous les résumons brièvement en suivant l'ordre chronologique :

1^o BARGER (8), ayant préparé la tyramine suivant la méthode de PSCHORR, WOLFES et BUCKOV (110) par réduction du *para*hydroxyphenylacétonitrile, tenta de la méthyler pour retrouver l'hordénine de LÉGER (87). La méthylation au moyen de l'iodure de méthyle ne conduit malheureusement qu'à l'iodure de base quaternaire d'ailleurs identifié avec l'iodométhylate d'hordénine.

L'auteur anglais fait remarquer que le corps desoxyhydrilé $\text{C}^6\text{H}^5 - \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \text{N}(\text{CH}^3)^2$ ne peut pas non plus être préparé par méthylation directe de la phényléthylamine correspondante. On n'obtient dans ce cas que les iodures

(1) Les « tyrosamines » de A. GAUTIER (51) $\text{C}^7\text{H}^9\text{NO}$, $\text{C}^8\text{H}^{11}\text{NO}$ et $\text{C}^9\text{H}^{13}\text{NO}$ sont des corps voisins de l'hordénine, mais leur constitution exacte n'a pas été définitivement éclaircie.

d'amine primaire et quaternaire. Cette même difficulté est d'ailleurs signalée par JOHNSON et GUEST (77).

Ce n'est qu'un peu plus tard que cette difficulté fut aplanie dans un brevet de BAEYER (6) : l'iodométhylate d'hordénine, par distillation dans le vide, se dissocie en iodure de méthyle et hordénine.

Pour cette raison, BARGER part de l'alcool phényléthylique $C^6H^5 - CH^2 - CH^2OH$, lequel chauffé avec ClH , ou mieux avec le chlorure de thionyle ou le pentachlorure de phosphore, donne le chlorure de phényléthyle $C^6H^5 - CH^2 - CH^2Cl$. Par chauffage en tube scellé avec une solution alcoolique de diméthylamine, on obtient le diméthylaminophényléthane $C^6H^5 - CH^2 - CH^2 - N(CH^3)^2$. Il suffit alors de créer la fonction phénol, ce que l'on réalise par nitration (formation de l' α -diméthylamino β *paranitrophényléthane* : $NO^2 - C^6H^4 - CH^2 - CH^2 - N(CH^3)^2$). Ultérieurement, le traitement par l'acide nitreux (ou par $NO^2Na + SO^4H^2$) conduit à l'hordénine $HO - C^6H^4 - CH^2 - CH^2 - N(CH^3)^2$. Le rendement final est très faible.

2° Comme BARGER, c'est après avoir réalisé une synthèse de la tyramine que Karl W. ROSENMUND (117) tente à son tour la méthylation de ce corps. C'est en réalité d'un produit méthoxylé dont part cet auteur pour préparer la tyramine : l'aldéhyde *paraméthoxybenzoïque* $CH^3 - O - C^6H^4 - CHO$, traité par le diazométhane $CH^3 NO^2$, donne un composé $CH^3 - O - C^6H^4 - CH = CH - NO^2$ qui, par réduction, conduit successivement à l'hydroxylamine correspondante : $CH^3 - O - C^6H^4 - CH^2 - CH = N - OH$ puis à l'amine : $CH^3 - O - C^6H^4 - CH^2 - CH^2 - NH^2$ (éther méthylique de la tyramine). La méthylation en milieu alcalin par l'iodure de méthyle conduit surtout, comme l'avait remarqué BARGER, au sel de base quaternaire. Toutefois en éliminant ce sel au moyen de l'eau, puis en se débarrassant des bases primaire et secondaire seules attaquées par l'anhydride acétique, on peut isoler de petites quantités d'hordénine (6 cg seulement à partir de 5 g de méthyltyramine).

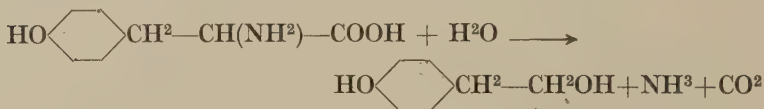
3° Dans une troisième synthèse, Hugo VOSWINCKEL (136) forme la chaîne méthylée de l'hordénine par action de la diméthylamine sur un dérivé chloré : la chlorométhylani-

sylcétone : $\text{CH}^3\text{O} - \text{C}^6\text{H}^4 - \text{CO} - \text{CH}^2\text{Cl}$, ce qui donne la *p*-méthoxyphényldiméthylamine :



L'iodhydrate de ce corps est à la fois déméthylé et réduit par chauffage à 125° en présence d'acide iodhydrique et de phosphore.

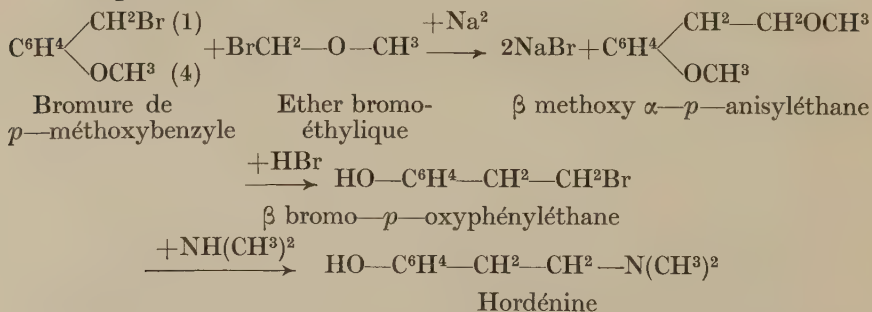
4^o Le point de départ de la synthèse réalisée par Félix EHRLICH et P. PISTSCHIMUKA (37) est l'alcool *para*-oxyphényléthylique ou tyrosol que l'un de ces auteurs (36) avait précédemment préparé d'une manière fort intéressante à partir de la tyrosine, au moyen de la levure cultivée sur milieu sucré et minéralisé :



Le dérivé chloré de cet alcool traité par la diméthylamine conduit directement à l'hordénine.

5^o La synthèse de l'hordénine par Ernst SPAETH et Philipp SOBEL (127) est la plus connue.

Après un premier échec en partant du bromure de *para*-anisylmagnésium, ces auteurs parviennent au résultat en prenant le bromure de *p*-méthoxybenzyle comme matière première. Les temps principaux de cette synthèse sont indiqués dans les réactions suivantes :



Une variante consiste à préparer le β -méthoxy — α anisyléthane en traitant le β -bromo-*p*-méthoxystyrolène à $160\text{--}170^\circ$ au moyen de méthoxyde de sodium, dans l'alcool méthylique. A côté du *p*-anisylacétylène, sans intérêt ici, le β -*p*-diméthoxystyrolène :



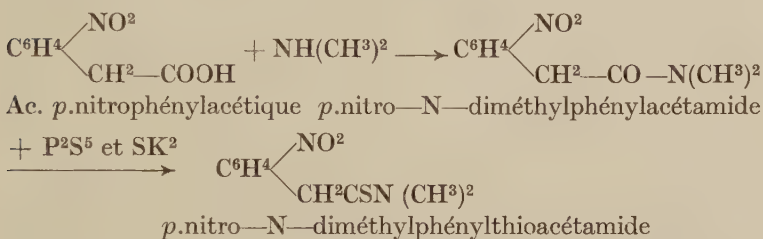
hydrogéné en présence de SO^4Ba palladisé conduit au β -méthoxy α -anisyléthane.

6° Plus récemment, KINDLER fournit deux synthèses assez particulières de l'hordénine.

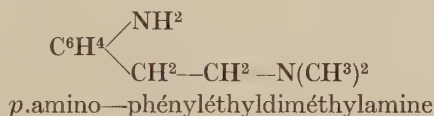
Après avoir examiné les procédés permettant d'obtenir des thiamides soit :

- a) à partir des nitriles traités par H^2S ;
- b) à partir des amides traités par P^2S^5 ou K^2S^3 ;
- c) à partir des sels d'ammonium des acides organiques traités par Al^2S^3 ;
- d) à partir des aldéhydes traités par NH^3 et S.

Ces thiamides sont réduites électrolytiquement à l'état d'amines, d'où les synthèses de l'hydrastine et, qui nous intéresse, de l'hordénine (en collaboration avec P. FINNDORF, 79) :



Ce dernier corps, par réduction électrolytique en milieu sulfurique, conduit à :

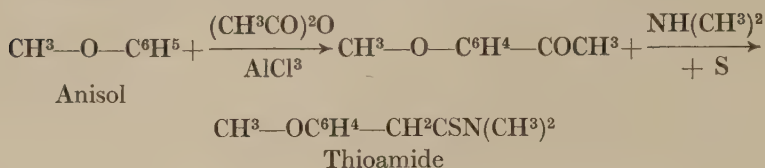


dont le diazoïque est décomposé à l'ébullition en hordénine. Le rendement de chacune de ces réactions serait supérieur à 90 %.

Enfin, dernièrement, le même auteur (80) expose une synthèse un peu différente de l'hordénine dont le principe consiste à passer des aldéhydes aromatiques aux β aryléthylamines par l'intermédiaire des nitrile-alcools : $\text{Ar} - \text{CHOH} - \text{CN}$, ces derniers acétylés puis transformés en thio-amides :

$\text{Ar} - \text{CH}(\text{OCOCH}^3)\text{CSNH}^2$, donnent par réduction catalytique, des amines du type $\text{Ar} - \text{CH}^2 - \text{CH}^2 - \text{NH}^2$.

Donc, deux points de départ pour l'hordénine : l'acide *p*-nitrophényl acétique (vu précédemment) et l'anisol :



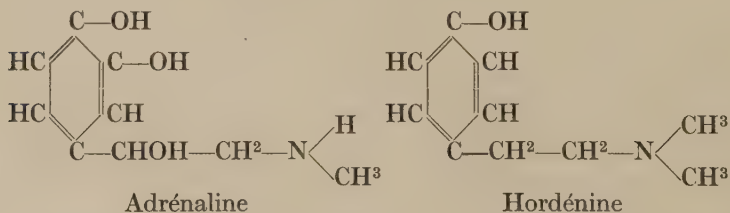
La thioamide, après réduction, fournit l'hordénine. Un corps possédant un oxhydrile phénolique de plus que l'hordénine a pu être préparé de façon analogue.

PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES

Les propriétés pharmacologiques de l'hordénine ne nous intéressent pas ici directement. Cependant, nous avons pensé que la monographie de l'hordénine que nous traçons dans cet historique serait incomplète sans un rappel des travaux accomplis à ce sujet et dont certains sont très récents.

Puisque c'est d'un usage thérapeutique des touraillons, d'ailleurs plus ou moins fondé, qu'est venue l'idée de rechercher dans ceux-ci quelque principe actif, la découverte de l'hordénine devait amener CAMUS (25) à vérifier, dès 1906, si les propriétés de l'alcaloïde coïncident avec celles de la drogue.

Il montre la faible toxicité de l'hordénine sur le Chien et le Lapin et constate une élévation modérée de la pression sanguine. A ce sujet, l'auteur fait remarquer la parenté de formule de l'alcaloïde avec l'adrénaline qui possède cette propriété à un degré bien plus élevé :



A haute dose, l'hordénine produit des intoxications se traduisant par des troubles nerveux corticaux, puis bulbaires

(cessation de la respiration). Les doses élevées diminuent l'excitabilité du pneumogastrique, des grands splanchniques sécrétoires ainsi que celle des muscles lisses striés.

Elle aurait, d'après CAMUS, une action inhibante sur la pepsine et la trypsine et serait, à la concentration de 4 %, bactéricide pour le vibron cholérique, le bacille d'Eberth et le *Bacterium coli*. L'alcaloïde se retrouve en faible quantité dans les urines d'animaux traités par ce corps.

En 1908, J. SABRAZÈS et G. GUÉRIVE (120) signalent que sur 16 cas de diarrhées infantiles, 7 sont guéris à la suite d'un traitement au moyen de 5 cg d'hordénine par jour et année d'âge; 6 cas de dysenterie des pays chauds auraient également été guéris. Elle n'aurait que peu d'effet dans la fièvre typhoïde. Elle constitue un tonicardiaque dans les cas de dépression du myocarde et hyposystolie, mais est bien moins active que les préparations de Digitale.

BARGER et DALE (9), en 1910, classent l'hordénine dans le groupe des substances sympathomimétiques, tout en remarquant la faiblesse de son activité comparée à celle de la base non méthylée (tyramine). De plus, ils constatent que le sel quaternaire, l'iodométhylate, a une action très comparable à celle de la nicotine, c'est-à-dire provoque, en injection intra-veineuse, l'arrêt de quelques battements cardiaques, puis une brusque élévation de la pression sanguine suivie d'une baisse rapide. Ce fait avait déjà été constaté pour divers sels quaternaires d'alcaloïdes.

La même année, EWIN et LAIDLAW (42) constatent que l'hordénine se transforme dans l'organisme en acide *para*-oxyphénylacétique, mais en faible proportion. Celle-ci augmente lorsque l'on passe au dérivé mono-méthylé puis à la base primaire.

Nous ne nous étendrons pas sur les propriétés pharmacologiques de quelques homologues de l'hordénine étudiées en 1912 par J. W. BRAUN (21).

En 1914, JACKSON (74) montre que les bronches sont dilatées sous l'influence de l'hordénine comme sous l'action de l'adrénaline; une constatation du même ordre est faite par BRY (22).

BAEHR et PICK (5), en 1916 trouvent que la nicotine injectée à un animal empêche l'action hypertensive de l'hordénine, mais non celle de l'adrénaline.

Nous ne ferons qu'indiquer les références des travaux de ADLER (3), PICO (103), ABELIN (2) et EICHHOLTZ (38) qui, de 1921 à 1924, n'apportent que peu de chose aux propriétés déjà signalées.

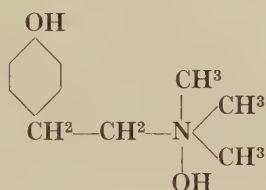
Par contre, voulant préciser ce que l'on a appelé l'action nicotinique de l'hordénine, HOUSSAY et MOLINELLI (73) puis MOLINELLI (98) utilisent la méthode d'anastomose surrénalo-jugulaire de Tournade et concluent que le sulfate d'hordénine ne produit pas d'augmentation de la sécrétion adrénalique, contrairement à la nicotine et substances apparentées. R. HAMET (59) publie d'ailleurs sur ce point, à la suite de ses propres recherches, une excellente mise au point en 1930.

Revenant sur l'explication que l'on peut donner du pouvoir vaso-constricteur de l'hordénine, mais insistant surtout sur l'action hyperglycémiant qui l'accompagne, G. TANRET (130) indique, qu'à la suite de R. HAMET, on doit admettre que l'hordénine provoque chez le chien normal une décharge d'adrénaline. Ceci montrerait que l'hordénine ne provoque peut-être l'hypertension et l'hyperglycémie que d'une façon indirecte (en contradiction avec les conclusions de MOLINELLI).

Enfin, d'après les plus récents travaux de R. HAMET, à doses fortes et répétées, l'hordénine est non plus hypertensive mais hypotensive et vasodilatatrice, propriété également présentée par la nicotine (60). Elle aurait de plus, à haute dose, une propriété sympathicolytique, c'est-à-dire le pouvoir de transformer l'action vasoconstrictive et hypertensive des doses moyennes d'adrénaline en une action vasodilatatrice et hypotensive (61).

Il est intéressant de noter que l'essai pharmacodynamique d'extraits tels que celui de la Cactée *Trichocereus candicans* Br. et Rose, effectué par LUDUENA (93), montre des particularités qu'expliquerait la présence d'hordénine. Dans les extraits très impurs, l'action de l'alcaloïde peut être en partie masquée. Cependant, il se produit lors de l'injection à l'ani-

mal une hypertension marquée et une action nicotinique très nette, comparable à celle produite par certains sels d'ammonium quaternaires. Ce dernier fait a incité L. RETI (112) à rechercher si, à côté de l'hordénine ou anhaline, ne se trouvait pas quelque sel quaternaire; il put en effet isoler sous forme d'iodure, l'hydrate de *p*-oxyphényléthyltriméthylammonium :



Enfin, l'essai physiologique de ce corps, par J. T. LEWIS et LUDUENA (92), est analogue à celui de la fraction de l'extrait de *Trichocereus* débarrassée d'hordénine; l'action est donc franchement nicotinique.

PREMIÈRE PARTIE

ESSAI DE PHYTOSYNTHESE

CHAPITRE PREMIER

PASSAGE DE LA TYROSINE A L'HORDÉNINE

Nous avons vu, dans le bref rappel des hypothèses sur l'origine des alcaloïdes, qu'un grand nombre d'auteurs, parmi lesquels PICTET, WINTERSTEIN, TRIER, les considèrent comme provenant des matières protidiques ou de leurs produits d'hydrolyse, les amino-acides. L'un des exemples les plus fréquemment cités pour illustrer cette thèse (traités de M. POLONOVSKI et A. LESPAGNOL **109**, de P. THOMAS **132**), est la succession des substances qui, de la tyrosine, conduisent par la tyramine et l'hordénine aux bases de *l'Anhalonium* à noyau isoquinoléique (voir formules p. 20 et 21).

C'est plus précisément aux possibilités de passage *in vitro* de la tyrosine à la tyramine puis à l'hordénine, en suivant des méthodes présentant le maximum de probabilités de réalisation dans la plante, qu'est consacrée cette première partie de notre mémoire.

Les chimistes entreprennent le plus souvent la synthèse de substances biologiques soit pour vérifier une formule, soit pour effectuer une préparation industrielle; ainsi avons-nous signalé un certain nombre de synthèses de l'hordénine faites dans cet esprit. Aucune ne s'inspirant d'un point de vue biologique, nous avons voulu combler cette lacune.

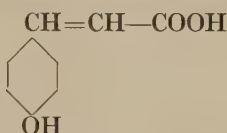
Dans un premier chapitre, nous examinons tout d'abord, le passage de la tyrosine à la tyramine (nécessitant une

décarboxylation) puis de la tyramine à l'hordénine (diméthylation à l'azote). La transformation inverse hordénine-tyrosine pouvant également être envisagée dans la nature, son étude fait l'objet d'un second chapitre.

On pourrait assurément se demander si la décarboxylation doit être envisagée avant la diméthylation ou inversement. Dans cette deuxième hypothèse, le corps intermédiaire entre la tyrosine et l'hordénine serait non plus la tyramine mais la di-méthyl-tyrosine. Les chances des deux possibilités ne nous semblent cependant pas égales pour les raisons suivantes :

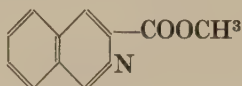
La présence d'amines telles que la putrescine et la cadavérine dans les tissus en putréfaction ou de tyramine dans l'Ergot, toutes bases dérivant d'acides aminés par simple décarboxylation, semble indiquer que cette opération se réalise aisément dans la nature. De son côté la méthylation des amines est aisée.

Par contre la tyrosine, par exemple, est difficile à méthyler directement. Elle tend à donner de la triméthylamine et des acides non saturés comme l'acide *para*-oxycoumarique (55).



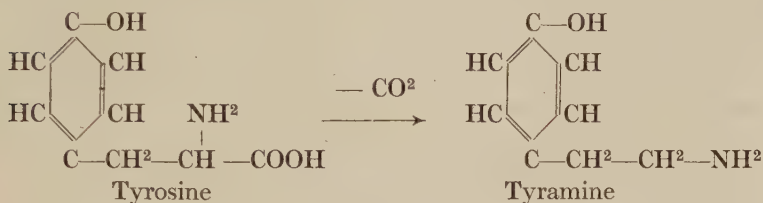
Pour ces raisons, nous inclinons pour la décarboxylation intervenant avant la méthylation.

Il faut cependant signaler un cas particulier qui prouve en faveur de l'ordre inverse : c'est celui de l'alcaloïde isolé par F. S. BEATTIE (10) dans le *Syndesmon thalictroïdes* Hoffm. et qui renferme encore le groupement carboxyle de l'acide aminé dont on suppose qu'il provient :



A. — DÉCARBOXYLATION DE LA TYROSINE

La dégradation de la tyrosine par les bactéries a été l'objet de recherches nombreuses. Le *Bacterium coli* produit une décarboxylation conduisant à la *para*-oxyphényléthylamine ou tyramine avec un rendement pouvant atteindre 80 % de la théorie :



D'une façon générale, la décarboxylation peut être réalisée non seulement par les bactéries, mais encore par les végétaux supérieurs et les animaux; mais comme l'écrit GUGENHEIM (55) dans son traité sur les amines biologiques, « on n'a pas encore réussi à isoler de ferment décarboxylant gardant son action spécifique en dehors de la cellule ».

Dans ces conditions, nous avons dû nous contenter de passer de la tyrosine à la tyramine par une méthode peu « biologique » en raison de la haute température utilisée mais qui a le mérite de ne faire intervenir aucun réactif. Il s'agit de la décomposition de l'acide aminé par la chaleur sous pression réduite. Cette technique avait déjà été utilisée à plusieurs reprises et G. BERTRAND la signale dans son étude de l'action de la tyrosinase sur certaines substances, dont la tyramine (14). Nous en précisons exactement les conditions conduisant au meilleur rendement :

Nous opérons dans un tube à boule muni d'une allonge conique identique à celui utilisé pour le dosage de l'hordénine (voir fig. 3), mais en raison de la faible densité de la tyrosine, la boule a ici une capacité d'environ 50 cm³, nécessaire pour placer une prise d'essai de 2 g de l'acide aminé sans trop tasser. Nous chauffons la boule au four électrique à 250° tandis que l'allonge est très énergiquement refroidie par un courant d'eau. Le vide est entretenu au moyen d'une pompe

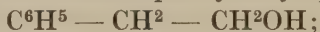
fonctionnant dans l'huile. Pendant toute la durée de la décarboxylation et malgré la pompe qui élimine CO^2 au fur et à mesure de sa formation, la tension de vapeur de celui-ci est d'environ 1 cm de mercure. Lorsque le vide, après quelque temps, s'approfondit vers 1/5 de mm de mercure, on est prévenu que la décarboxylation est terminée. Le produit obtenu étant toujours coloré par des produits goudronneux et phénoliques, nous effectuons la première condensation dans le rodage séparant le tube à boule de son allonge; ceci permet, en repoussant le tube dans le four, d'opérer une sublimation réalisée à $+ 160-170^\circ \text{C}$. Dans ces conditions le rendement en tyramine cristallisée en beaux arbuscules parfaitement incolores atteint 50 % de la théorie.

Nous avons préparé de cette manière la totalité de la tyramine utilisée dans les expériences ultérieures.

B. — MÉTHYLATION DE LA TYRAMINE

Nous avons vu que les premiers auteurs qui ont tenté la synthèse de l'hordénine ont essayé la méthylation de la tyramine suivant le procédé classique à l'aide de l'iodure de méthyle en milieu alcalin. Ils se sont heurtés à la difficulté de s'arrêter au produit diméthylé à l'azote, la réaction se poursuivant jusqu'au stade sel quaternaire. Seule la décomposition thermique de ce sel permet l'obtention de l'hordénine (Brevet BAEYER). En raison de ces difficultés, toutes les synthèses de l'hordénine s'adressent à une substance de départ autre que la tyramine.

BARGER part de l'alcool phényléthylique :



Hugo VOSWINKEL, de la chlorométhylanisylcétone $\text{CH}^3\text{O} - \text{C}^6\text{H}^4 - \text{CO} - \text{CH}^2\text{Cl}$; Ernst SPAETH et Philipp

SOBEL, du bromure de *p*. methoxybenzyle : $\text{C}^6\text{H}^4 \begin{cases} \text{CH}^2\text{Br} \\ \text{OCH}^3 \end{cases}$

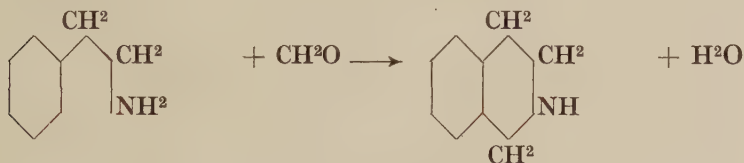
KINDLER et FINNDORF, du chlorhydrate de l'acide paranitrophénylacétique : $\text{C}^6\text{H}^4 \begin{cases} \text{CH}^2\text{Br} \\ \text{CH}^2 - \text{COOH} \end{cases}$

Mention spéciale doit être faite de la synthèse de Felix EHRLICH et P. PISTSCHIMUKA (voir p. 36), car ces auteurs

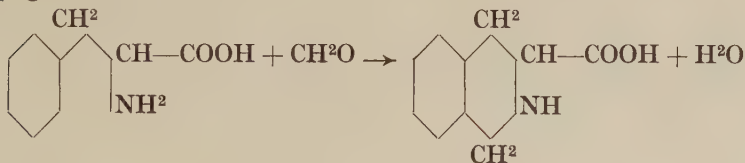
transforment la tyrosine en tyrosol ou alcool *para*oxyphényléthylque, au moyen de la levure, avec des rendements de 60 à 80 %. Le tyrosol est ensuite traité par la diméthylamine pour conduire à l'hordénine. La première partie de cette synthèse est intéressante à notre point de vue parce que les auteurs pensent que le passage de la tyrosine à l'hordénine pourrait se faire dans la nature par l'intermédiaire d'un alcool aromatique.

Nous ferons remarquer que toutes les méthylations, décrites en détail à propos des méthodes de synthèse de l'hordénine, sont réalisées sans exception au moyen de l'iodure de méthyle ou encore par introduction d'une molécule déjà diméthylée à l'azote comme la diméthylamine. Le problème d'une méthylation à l'azote selon un schéma admissible dans les conditions naturelles reste donc entier.

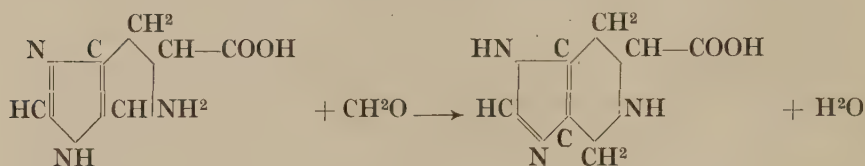
La première allusion au rôle que pourrait jouer l'*aldéhyde formique* dans les synthèses d'alcaloïdes remonte à PICTET. L'existence de cette substance si simple dans les végétaux est par ailleurs sinon démontrée, du moins très souvent considérée comme inévitable pour l'élaboration des sucres. En collaboration avec SPENGLER, PICTET (105) traite la phényléthylamine en milieu acide par le méthylal (ce qui revient à faire agir l'aldéhyde formique) et obtient une cyclisation de la chaîne latérale par intercalation d'un chaînon CH^2 :



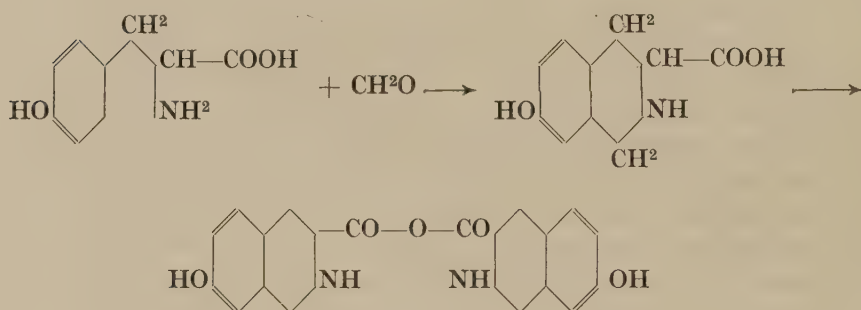
Dans les mêmes conditions, la phénylalanine conduit à un corps très voisin de l'alcaloïde carboxylé du *Syndesmon thalictroides* Hoffm. dont nous avons donné la formule page 44.



Un peu plus tard, Julius WELLISCH (138) applique cette technique à l'histidine en se servant comme générateur d'aldéhyde formique de « méthylen glycol » en présence de ClH concentré. La réaction est la suivante :

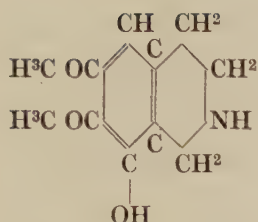


Appliquée à la tyrosine, la méthode conduit à un acide p. oxytétrahydroisoquinoléine-carbonique et même à son anhydride :



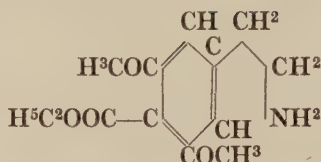
Voici l'essentiel de la technique, important à connaître, la nature des corps obtenus dépendant étroitement des conditions expérimentales : 13 g de tyrosine sont ajoutés à 75 g de ClH concentré. On chauffe au réfrigérant ascendant au bain-marie en ajoutant par portions 19 g de méthylal. Après 12 à 14 heures, on évapore à sec, reprend par l'ammoniaque, précipite par l'acide acétique puis lave à l'alcool. Le corps obtenu fond à + 360° C. mais se décompose à partir de + 195° C.

Plus intéressante pour nous est l'utilisation d'une condensation de ce type pour effectuer la synthèse de l'anhalamine, alcaloïde du groupe de l'*Anhalonium*, selon E. SPAETH et Hans RÖDER (125).

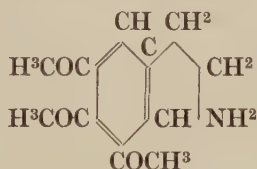


Anhalamine

Le point de départ est l'amine :



possédant un noyau *para*oxyphénylaminé comme l'hordénine, noyau que ses substitutions rapprochent de la mezcaline, autre base naturelle du même groupe :

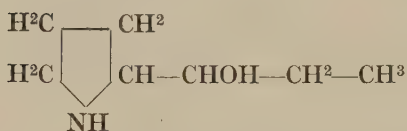


L'aldéhyde formique est encore utilisé comme agent de condensation dans la synthèse de la morphine à partir de la nor-laudanosine, que cite R. ROBINSON (116). D'autres termes de la série aldéhydrique peuvent être utilisés, notamment l'acétaldéhyde, dans les synthèses du groupe de la papavérine et de la berbérine.

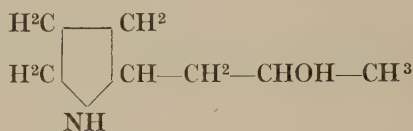
Ainsi, voyons-nous, dans les exemples précédemment indiqués, le formol intervenir comme *agent de cyclisation* et servir à la synthèse *in vitro* d'alcaloïdes. Nous n'avons indiqué ici que les expériences effectivement réalisées car, d'une manière spéculative, Robinson a pu construire à partir précisément de l'aldéhyde formique, de l'ammoniaque et de quelques acides aminés, presque tous les alcaloïdes actuellement connus.

Pourtant, parmi les rôles multiples que la haute réactivité de l'aldéhyde formique permet d'entrevoir, c'est celui d'*agent de méthylation* qui nous retiendra ici. Cette notion est due à PICTET bien que cet auteur n'ait réalisé, comme nous venons de le voir, que des réactions de cyclisation avec ce corps. Les expériences faites dans le but de méthyler à

l'azote un dérivé, *in vitro*, et dans des conditions expérimentales biologiquement possibles, sont rares. Cependant K. HESS (68), en raison de la difficulté de méthyler à l'azote au moyen de l'iodure de méthyle deux dérivés de la pyrrolidine : l' α -pyrrolidylpropanol — 1 et l' α -pyrrolidylpropanol — 2 :

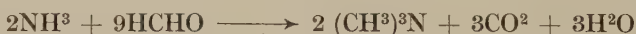


α — pyrrolidylpropanol — 1



α — pyrrolidylpropanol — 2

nécessaires pour la synthèse de l'hygrine, eut l'idée d'appliquer une méthode brevetée par ESCHWEILER (40) en 1893 et publiée un peu plus tard en collaboration avec KOEPPEN (41). Cette méthode consiste à chauffer en vase clos vers 115-120° les amines, ou mieux leurs sels, en présence d'aldéhyde formique. K. HESS montre qu'à côté de la méthylation à l'azote, il y a déshydrogénation de la fonction alcool secondaire (donnant une cétone), l'hydrogène étant utilisé pour la formation des groupements méthyle liés à l'azote. Si l'on ajoute un corps susceptible de fournir facilement dans les conditions de l'expérience l'hydrogène nécessaire, tel que l'acide formique, il n'y a plus déshydrogénation de la chaîne latérale. Dans ce cas, on observe un départ de gaz carbonique comme dans la réaction d'ESCHWEILER avec l'ammoniaque :



où l'excès d'aldéhyde formique joue un rôle réducteur que l'on explique par la formation intermédiaire d'acide formique, en raison du CO_2 dégagé.

L'idée d'ajouter de l'acide formique provient donc de l'explication théorique que l'on peut donner de la réaction d'ESCHWEILER et, aussi, d'une ancienne réaction de CAMBIER et BROCHET (23) où les mono, di et triméthylamines sont préparées par chauffage d'un excès d'aldéhyde formique et d'hexaméthylène tétramine à + 150° C. La monométhylamine peut être plus particulièrement préparée, d'après les mêmes auteurs (24), par action de l'aldéhyde formique sur le chlorure d'ammonium en solution aqueuse. Or, d'après

E. A. WERNER (139), dans cette réaction également, une partie de l'aldéhyde formique se transforme en acide formique, fournissant par décomposition de l'hydrogène et du gaz carbonique.

K. HESS étendit cette méthode de méthylation aux alcaloïdes suivants : pelletierine (69), conicine et conhydrine (70), guvacine (71).

Il est assez remarquable que malgré ces travaux, qu'il cite d'ailleurs dans son traité sur les alcaloïdes, TRIER (144) refuse à l'aldéhyde formique le rôle très probable d'agent de méthylation *direct* dans la nature; il prêterait ce rôle à l'alcool méthylique provenant d'ailleurs de l'aldéhyde formique par une réaction de CANNIZZARRO. Cette façon de voir a l'avantage de faire apparaître, à côté de l'alcool méthylique, l'acide formique dont nous avons besoin :



L'alcool méthylique formé interviendrait plutôt, selon nous, dans des estérifications variées et non dans la méthylation à l'azote proprement dite.

En effet, le mécanisme de cette méthylation a reçu en chimie organique pure de nombreux éclaircissements à la suite des travaux de M. SOMMELET et de ses élèves. On peut trouver dans la thèse de l'un de ces derniers, J. MESROBIAN (96), une mise au point de la question.

C'est ainsi que GUIOTH (56) prépare des amines tertiaires N-diméthylées par action de l'acide formique en solution aqueuse sur les sels quaternaires d'hexaméthylène — tétramine. On retrouve également dans les travaux de L. BOURGEOIS (20), de JEANTET (76), de BARDAN (7) et de MESROBIAN (96) de nombreuses méthylations à l'azote par la méthode utilisant soit l'aldéhyde formique seul, soit un mélange d'aldéhyde et d'acide formiques. Les substances utilisées au départ dans ces recherches sont le plus souvent d'origine non biologique.

Ce rapide exposé de quelques utilisations de l'aldéhyde formique dans la synthèse organique, exposé que nous limitons aux recherches pouvant intéresser les schémas de « phytosynthèse », nous a paru nécessaire à la compréhension de nos expériences.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Première expérience : Nous réalisons tout d'abord sans modification la technique classique des élèves de M. SOMMELET où l'aldéhyde et l'acide formiques sont à la fois utilisés.

Pour une molécule d'amine, nous employons 2,2 molécules d'aldéhyde formique et 8 molécules (un large excès) d'acide formique.

0,80 g de tyramine (provenant de la décarboxylation de la tyrosine) sont placés dans un petit ballon. On ajoute successivement 1,1 cm³ de solution à 40 % d'aldéhyde formique et 2,14 g d'acide formique (Poulenc U. S.) puis 4,8 cm³ d'eau. Après agitation pendant quelques minutes, toute la tyramine est dissoute. On chauffe le tout à reflux pendant une dizaine d'heures au bain de glycérol, de manière à entretenir une ébullition tranquille.

Le liquide du ballon est alors neutralisé au moyen d'une solution saturée de carbonate d'ammonium et épuisé 10 fois par l'éther (cette extraction se fait dans un tube cylindrique tournant sur lui-même et décrit à propos du dosage de l'hordénine. Les liqueurs éthérées sont concentrées à petit volume (5 à 6 cm³) et transvasées dans un tube à boule pour sublimation. On achève l'évaporation à sec à l'étuve électrique (fig. 4) et le produit huileux obtenu est distillé sous une pression réduite de 1 mm de mercure à + 105° C. Les cristaux incolores obtenus fondent à + 118° C. (le point de fusion reste + 118° C. après mélange avec de l'hordénine); ils donnent toutes les réactions de cet alcaloïde. Poids obtenu : 0,42 g (rendement 50 % environ).

Dans quelle mesure cette méthylation représente-t-elle une possibilité biologique?

La tyramine existe dans la nature, abondante dans l'Ergot de Seigle. Sa présence dans les germes d'Orge reste à démontrer et nous nous attachons à ce problème dans la troisième partie de ce travail, chapitre II. Reste l'aldéhyde formique. On connaît les grandes difficultés que l'on éprouve à déceler sa présence dans les végétaux; cependant son existence, au moins transitoire, est admise dans les tissus *chlorophylliens*.

L'acide formique paraît moins essentiel puisque les méthylations de ce type peuvent être conduites avec le seul aldéhyde formique à condition d'opérer à plus haute température, en tube scellé. On peut même considérer que toute substance susceptible de céder de l'hydrogène est capable de remplacer l'acide formique.

La température élevée utilisée dans notre première expérience (100°) n'étant jamais réalisée dans la nature, nous tentons une deuxième expérience à froid :

Deuxième expérience. — 0,25 g de tyramine sont placés dans un petit ballon où l'on ajoute successivement 0,30 cm³ de solution à 40 % d'aldéhyde formique, 0,70 g d'acide formique et 2 cm³ d'eau. Après une semaine de contact, la moitié du liquide est prélevée et traitée comme précédemment; on ne recueille dans ce cas que quelques cristaux (1,2 mg) ayant l'aspect d'hordénine; F : + 118° C.

Après un mois, l'autre moitié est traitée de même et fournit cette fois 0,0205 g d'hordénine, soit un rendement de 16 % environ.

Ainsi à froid, mais lentement, la méthylation par cette méthode est possible. Par contre des tentatives d'hydrogénation du mélange tyramine + aldéhyde formique par l'hydrogène en présence de catalyseurs variés ont échoué (1).

L'intérêt de cette synthèse de l'hordénine nous paraît ressortir de ce fait que Michel POLONOVSKI fait remarquer dans la conférence déjà citée : « l'anhaline (ou hordénine), seul monophénol parmi tous les alcaloïdes des Cactacées est dans une espèce assez spéciale d'*Anhalonium*, l'*A. fissuratum* Engelm, tous les autres alcaloïdes ayant été isolés des *A. Lewinii* Hennings et *Williamsii* Salm-Dyck... ». Nous ajouterons que seule l'hordénine est méthylée à l'azote tandis que tous les autres alcaloïdes (voir formule p. 20 et 21) à l'exception de la pellotine ne le sont pas.

(1) Nous avons également tenté de méthyler la tyramine en nous arrêtant au stade du dérivé mono-méthylé. Pour cela nous avons réduit la quantité d'aldéhyde formique à la quantité juste nécessaire (1 molécule pour 1 molécule d'amine). Nous avons pu isoler dans ces conditions une petite quantité de mono-méthyl-tyramine.

Ainsi l'aldéhyde formique agissant sur la tyramine peut conduire :

1^o à l'hordénine, alcaloïde diméthylé à l'azote et à noyau *para*oxyphényléthylamine dans les conditions de notre synthèse;

2^o à tous les autres alcaloïdes du groupe de l'*Anhalonium* (à l'exception de la pellotine) par fermeture du noyau *para*oxyphényléthylaminé sous forme d'un nouveau noyau tétrahydroisoquinoléique; la méthode est celle de PICTET et a été effectivement réalisée par SPAETH dans la synthèse de l'anhalamine. Dans ce cas, *pas* de méthylation à l'azote;

3^o à la pellotine par une juxtaposition des deux modes d'action précédents : noyau tétrahydroisoquinoléique et méthylation à l'azote.

L'hordénine d'après nos recherches (III^e partie, ch. II) paraissant bien être le seul alcaloïde des racelles d'Orge, ces dernières doivent être rapprochées de l'*Anhalonium fissuratum* Engelm qui le renferme aussi d'une façon exclusive.

Certains auteurs, parmi lesquels Torquato TORQUATI, et nous-même (III^e partie, ch. III) remarquant une disparition de l'alcaloïde au cours de la germination, il est intéressant de tenter dans le même esprit que précédemment la transformation inverse : hordénine-tyrosine. C'est ce que nous étudions dans le chapitre II.

CHAPITRE II

PASSAGE DE L'HORDÉNINE A LA TYROSINE

Le problème comporte deux parties symétriques de celles envisagées dans le chapitre I : déméthylation, carboxylation.

A. — DÉMÉTHYLATION DE L'HORDÉNINE

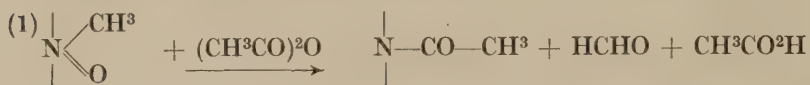
Si la méthylation apparaît sous un certain angle comme une *réduction* (l'hydrogène étant emprunté soit à l'aldéhyde formique, soit à l'acide formique, soit même à une fonction déshydrogénable de la molécule), la déméthylation apparaît de son côté comme une *oxydation*. Les agents déméthylants sont souvent des oxydants : le permanganate de potassium (à condition qu'il n'existe pas de groupement trop facile à oxyder), l'acide hypochloreux (R. WILLSTAETTER et F. IGLAUER 142). On connaît toutefois des méthodes un peu différentes, comme celles de LADENBURG (83) : distillation sèche du chlorhydrate de base tertiaire; de HERZIG et MEYER, où l'on dose les groupements méthyle arrachés au moyen de l'acide iodhydrique et, enfin, de O. DIELS (34) à l'aide de l'azodicarboxylate d'éthyle. Ces trois dernières méthodes se rattachent à un processus d'oxydation par l'intermédiaire d'une déshydrogénation.

Nous reprochons à toutes ces méthodes et la nature des corps utilisés et la brutalité des conditions expérimentales qui les privent de toute vraisemblance biologique.

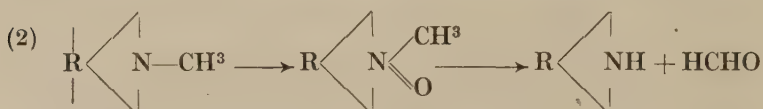
Il n'en est pas tout à fait de même de la technique de Max et Michel POLONOVSKI (107) où l'on passe par l'intermédiaire de l'oxyamino dérivé de l'alcaloïde. L'aminoxyde (1) s'obtient en traitant la base par l'eau oxy-

(1) Encore appelé par M. et M. POLONOVSKI « genalcoloïde ».

génée (106). En vue de la déméthylation, ce corps est traité par l'anhydride acétique dont le rôle est de faciliter une transposition moléculaire :



L'inconvénient est que l'on obtient un produit acétylé à l'azote et éventuellement aux fonctions alcool. Il est donc nécessaire de saponifier. (Parmi les groupements acétyle, c'est celui fixé à l'azote qui présente le plus de résistance à l'hydrolyse). Le schéma de la réaction peut s'écrire globalement :



Malgré l'intervention peu « biologique » de l'anhydride acétique (les conditions des tautomérisations dans la nature étant encore inconnues), nous avons retenu et utilisé ce procédé pour les raisons suivantes :

1° l'existence au moins transitoire d'eau oxygénée n'est pas improbable dans la réalité (conditions d'action des peroxydiastases) ;

2° la formation d'aldéhyde formique (équation 2) fait apparaître cette déméthylation comme une réaction *exactement inverse* de la méthylation que nous avons effectuée dans la synthèse.

Dans un cas, l'aldéhyde formique *méthyle* en milieu réducteur, dans l'autre il y a *déméthylation* en milieu oxydant avec apparition d'aldéhyde formique, ce que l'on peut schématiser dans l'équation réversible suivante :

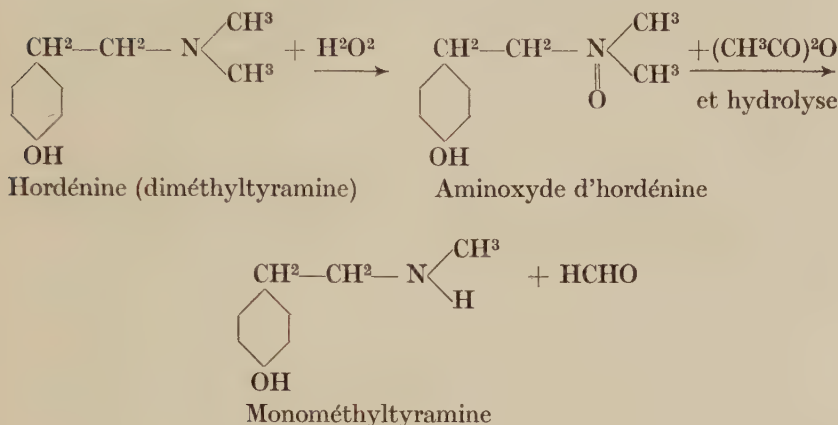


M. et M. POLONOVSKI donnent surtout des exemples de déméthylation d'alcaloïdes N — *mono* méthylés tels que ceux du groupe du tropane, du granatane et de la nicotine, où l'azote n'est jamais à l'extrémité d'une chaîne.

Dans le cas de l'hordénine, au contraire, nous avons un corps N-*diméthylé* et, théoriquement, la réaction ne doit

nous conduire, dans un premier temps, qu'à un dérivé N-monométhylé.

Les réactions que l'on peut prévoir sont les suivantes :



Nous étudierons plus loin l'ablation du second groupe méthyle.

L'aminooxyde d'hordénine (ou genhordénine) n'ayant pas été préparé ni décrit, nous sommes amené à combler cette lacune :

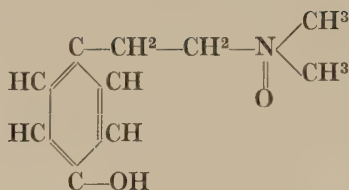
a) *Préparation de l'aminooxyde d'hordénine.* — Nous utilisons sans modification la méthode de Max et Michel POLO-NOVSKI (106).

3,50 g d'hordénine sont dissous dans la quantité suffisante d'alcool à 95°. On ajoute un léger excès d'eau oxygénée à 30 volumes, soit 0,50 g et l'on abandonne à froid pendant 3 jours.

L'excès de base initiale est éliminé à l'aide d'une agitation plusieurs fois répétée du liquide avec 2 volumes d'éther. Le produit brut obtenu après dessiccation dans le vide pèse 2,90 g. On purifie par recristallisation dans l'alcool absolu.

Comme la plupart des aminooxydes d'alcaloïdes décrits à ce jour, celui d'hordénine se présente sous forme de cristaux incolores très solubles dans l'eau. Il est également soluble dans l'alcool, mais est insoluble dans l'éther, le chloroforme, l'acétone, Fusion ; + 214° C,

Formule prévue :



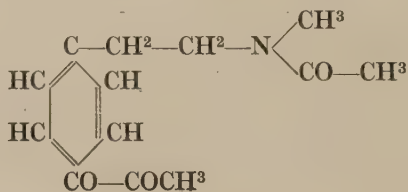
Formule brute : $C^{10}H^{15} NO^2$

b) *Obtention de la mono N-méthyltyramine.* — Nous suivons encore ici la technique de M. et M. POLONOVSKI (107).

2,50 g d'aminooxyde d'hordénine, desséchés par un séjour prolongé dans le vide au-dessus de l'acide sulfurique, est placé dans un petit ballon. On ajoute peu à peu, au moyen d'une boule à brome, 8 g d'anhydride acétique (cette quantité constitue un grand excès par rapport à la théorie). On agite constamment et, la réaction étant fortement exothermique, il est prudent de la modérer en maintenant le ballon dans un mélange réfrigérant (glace et sel). On abandonne quelques heures à froid puis on chauffe au bain-marie pendant 3 à 4 heures. La coloration du liquide devient alors brune. L'excès d'anhydride acétique est détruit par affusion d'alcool puis d'eau et l'on évapore le tout jusqu'à consistance sirupeuse.

On neutralise par addition d'un grand excès de carbonate de potassium et épuise à 5 ou 6 reprises au moyen d'éther bouillant; ce dernier dissout la totalité des produits acylés ainsi que des traces de produits basiques et d'aminooxyde inattaqué. La solution étherée, légèrement alcaline, est lavée avec de très petites quantités de SO^4H^2 dilué jusqu'à réaction neutre, puis avec quelques gouttes d'eau.

Après distillation de l'éther, reste une huile jaune, incristallisable, devant renfermer une substance de formule :



Le produit est alors hydrolysé pour éliminer les groupements acétyle fixés. Pour cela, les bases et les acides peuvent être utilisés. La potasse à diverses concentrations ne nous ayant pas donné de bons résultats dans des essais préliminaires, nous utilisons l'acide sulfurique à 15 %. On maintient l'ébullition par chauffage à reflux au bain de glycérol pendant 10 heures.

Le liquide est neutralisé par CO_3Ba . On filtre, évapore et soumet le produit, d'aspect huileux, à une distillation sous pression réduite. Il passe vers 150° un liquide incolore ne tardant pas à cristalliser sous forme de petites sphères. Par recristallisation dans l'alcool on obtient des aiguilles incolores fondant à $+129^\circ \text{C}$. (corr.).

Le corps donne avec intensité une coloration rouge avec le réactif de MILLON et une coloration verte avec l'acide sulfurique formolé ou le mélange SO_4H^2 -urotropine. Par son point de fusion et ses autres caractères, la substance obtenue est identique à la mono-N-méthyltyramine préparée par WINTERSTEIN (143) en chauffant de la N-mono-méthyltyrosine de synthèse à 250° (décarboxylation). Elle est aussi identique au corps préparé par BLAU (16) par distillation sèche de la ratanhine ou surinamine (méthyl-tyrosine naturelle) (1).

La mono-N-méthyltyramine est soluble dans l'eau et dans l'alcool.

Nous obtenons donc, comme nous pouvions le prévoir, le corps possédant *un seul* méthyle de moins que l'hordénine. En effet, l'aminoxyde de cet alcaloïde ne possédant *qu'un* atome d'oxygène fixé à l'azote, *un seul* groupement méthyle peut de ce fait être oxydé sous forme d'aldéhyde formique. Cette méthode apparaît donc très utile pour effectuer des déméthylations par paliers.

La technique de R. WILLSTAETTER et F. IGLAUER (142), à l'aide de l'acide hypochloreux ClOH , fait intervenir aussi

un composé d'addition : $\text{R} \begin{array}{c} \diagup \\ \text{N} \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{Cl} \\ \text{OH} \\ \text{CH}_3 \end{array}$ que M. et M. POLO-

(1) La surinamine encore appelée ratanhine, andirine ou angeline est extraite surtout des écorces de *Geoffroya surinamensis* Linné, Bondt,

NOVSKI préfèrent écrire $\begin{matrix} \text{R} \\ \text{R}' \end{matrix} \text{N} \begin{matrix} \text{H} \\ \text{OCl} \\ \text{CH}^3 \end{matrix}$; par un raisonnement

analogue à celui que nous venons de faire pour les aminoxydes, nous pouvons concevoir une déméthylation graduelle, mais cette conclusion n'est qu'hypothétique car les alcaloïdes déméthylés par WILLSTAETTER et IGLAUER : tropidine, tropane, N-méthyl-pipéridine n'ont qu'un seul groupement méthyle à éliminer, l'azote étant par ailleurs inclus dans un cycle. La même remarque s'applique à la méthode de Otto DIELS (34) à l'azodicarboxylate d'éthyle, rarement utilisée en raison de sa réalisation délicate.

c) *Passage de la monométhyltyramine à la tyramine.* — Bien que le fait de donner des dérivés aminoxydes soit essentiellement une propriété des bases tertiaires, il n'en demeure pas moins que l'on a pu préparer les composés correspondants de bases secondaires telles que la pyridine, la quinoléine et l'isoquinoléine.

Cependant, dans ce cas, on utilise fréquemment, au lieu d'eau oxygénée, une solution benzénique d'acide perbenzoïque suivant la technique de J. MEISENHEIMER (95).

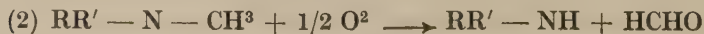
Ne possédant qu'une très petite quantité de monométhyl-tyramine provenant de la déméthylation partielle de l'hordénine et de la mono-méthylation de la tyramine, nous n'avons pas encore réussi à préparer cet aminoxyde.

La déméthylation par l'eau oxygénée et l'intermédiaire des aminoxydes est-elle la réaction exactement inverse de la méthylation par l'aldéhyde formique suivant la technique de K. Hess?

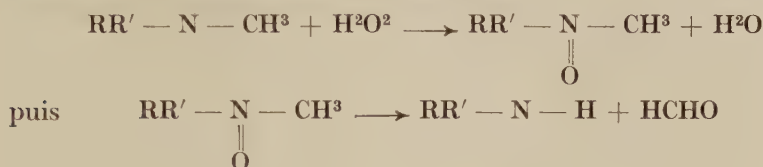
Nous avons signalé ce point qui nous avait incité à utiliser la réaction de M. et M. POLONOVSKI à propos de la déméthylation de l'hordénine. En effet, si l'on s'en tient aux stades principaux, on peut écrire la réaction de méthylation :



et celle de déméthylation suivant la technique de M. et M. POLONOVSKI :



Une des preuves de l'identité des deux réactions — au sens près — serait évidemment l'existence de composés intermédiaires identiques. Or, dans le cas de la déméthylation, le corps intermédiaire existe : c'est l'aminoxyde d'alcaloïde et la réaction (2) peut s'écrire :

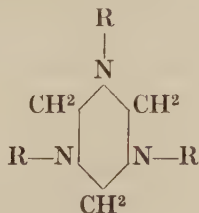


Par contre, dans la réaction (1) de méthylation, on n'a jamais pu isoler de corps intermédiaire. J. MESROBIAN (96) le tenta en se basant sur le fait que d'après les travaux de KOLOTOV (81) et ceux de HENRY (67), l'aldéhyde formique, en réagissant sur les amines primaires, donne lieu à la formation d'imines méthyléniques avec élimination d'une molécule d'eau :



J. MESROBIAN fit donc agir l'aldéhyde formique, à chaud, sur les α -phéno-alcoyl-amines *sans ajouter d'acide formique*. Il reprit par l'éther « qui s'empare de la base formée » mais constata que l'éther ne s'emparait pratiquement de rien et ne poursuivit pas plus loin l'essai de préparation de dérivés méthyléniques vraiment très hypothétiques.

Avant J. MESROBIAN, CAMBIER et BROCHET (23) avaient indiqué que les composés du type $\text{R} - \text{N} = \text{CH}^2$ (dérivés méthyléniques) devaient exister sous forme trimérisée en raison des densités de vapeur; la formule suivante explique en effet la disparition de toute double liaison éthylénique :

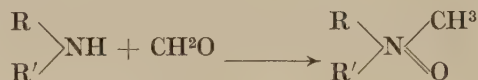


M. BARDAN (7) constata de même la saturation complète des produits obtenus par action de l'aldéhyde formique sur la benzylamine.

Il n'en demeure pas moins curieux que les auteurs utilisant la technique de méthylation à l'aide de l'aldéhyde formique continuent à faire intervenir ces « composés méthyléniques », lesquels seraient hydrogénés ultérieurement par l'acide formique suivant le schéma :



Puisque cette interprétation n'a pu recevoir de vérification expérimentale nous nous sommes demandé si l'on ne pouvait pas interpréter le premier stade de l'action de l'aldéhyde formique sur une amine comme une *addition sans élimination d'eau* :



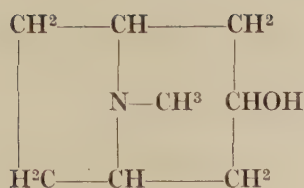
Le corps obtenu ne serait autre chose qu'un amino-oxyde et l'action ultérieure de l'acide formique pourrait être une réduction au lieu d'une hydrogénation :



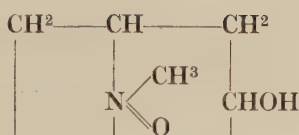
Nous avons tenté de vérifier ce point de vue. L'exemple du passage tyramine-hordénine ne nous a pas paru un très bon exemple car la théorie nous oblige, en raison de l'existence de 2 groupements méthyle, à supposer deux aminoxydes intermédiaires non encore décrits (1).

Pour cette vérification, nous avons choisi le tropanol dont l'aminoxyde est décrit par M. et M. POLONOVSKI (108). Nous avons préparé à nouveau ce composé et vérifié le point de fusion : + 238° C.

(1) Les petites quantités de l'un de ces aminoxydes, préparées par nous, furent utilisées soit pour sa détermination, soit pour les transformations qui ont fait l'objet des recherches antérieures.



Tropanol



aminoxyde de tropanol ou
genotropanol

Il nous fallait par ailleurs préparer le Nor-tropanol pour voir si l'action de l'aldéhyde formique pouvait donner naissance au génotropanol. Nous pouvions utiliser soit la technique de R. WILLSTAETTER (141) à l'aide de MnO^4K alcalin soit celle de M. et M. POLONOVSKI (107) où l'on passe par l'intermédiaire de l'aminoxyde soumis ultérieurement à l'action de l'anhydride acétique.

Nous avons choisi cette seconde méthode mais nous n'avons obtenu, en raison des quantités trop faibles mises en œuvre, que 0,05 g de Nor-tropanol. Nous n'avons pu faire qu'un seul essai à froid, en l'additionnant d'aldéhyde formique; dans ces conditions il ne se forme pas d'aminoxyde. D'autres essais devront être tentés dans cette voie.

Nous regrettons de ne pas avoir pu poursuivre plus avant cette vérification théorique car l'intérêt de l'hypothèse envisagée est de faire apparaître la méthylation et la déméthylation comme une annexe d'une réaction biologique bien autrement générale : l'oxydo-réduction.

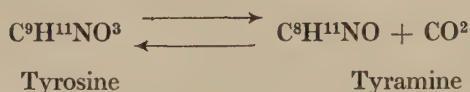
B. — CARBOXYLATION DE LA TYRAMINE

De cette carboxylation dans des conditions biologiques, on ne trouve guère qu'un exemple cité par BOTAZZI (19), où des extraits abandonnés plusieurs jours laissent apparaître de la tyrosine, considérée par l'auteur comme provenant de la tyramine. Ce fait est d'ailleurs contesté par HENZE (66).

Le problème des carboxylases n'est pas de son côté assez avancé pour permettre le passage *in vitro* que nous nous proposons.

Au point de vue purement chimique, on pourrait considérer la réaction de décarboxylation de la tyrosine que nous

avons réalisée dans le vide à 250° comme une réaction réversible :



Pour vérifier ceci, nous avons placé de la tyramine dans un tube scellé en présence d'un grand excès de gaz carbonique et avons chauffé jusqu'à 300° (pression atteinte : environ 2 atmosphères). Après dix heures, nous avons obtenu un produit goudronneux sans trace de tyrosine.

CONCLUSIONS DE LA PREMIÈRE PARTIE

Les résultats expérimentaux que nous présentons offrent de nombreuses lacunes surtout en ce qui concerne la décarboxylation et l'opération inverse. La méthylation et la déméthylation nous apportent au contraire des vues intéressantes qui ne peuvent que nous inciter à rechercher, cette fois dans la nature, la vérification de notre hypothèse de départ.

Au préalable se posent des problèmes de technique dont nous groupons l'étude dans la deuxième partie de ce mémoire.

DEUXIÈME PARTIE

TECHNIQUES

CHAPITRE PREMIER

DOSAGE DE L'HORDÉNINE

I. — REVUE CRITIQUE DES MÉTHODES ANTÉRIEURES

C'est à la méthode mise en œuvre la première fois en 1850 par STASS à l'occasion de l'expertise d'un empoisonnement par la nicotine, que LÉGER (85) s'adressa pour rechercher si l'activité des touraillons d'Orge était due à quelque principe alcaloïdique. La méthode est basée sur les trois remarques suivantes :

1° solubilité des sels d'alcaloïdes dans l'eau et dans l'alcool;

2° déplacement des alcaloïdes de leurs sels par les alcalis, les carbonates et les bicarbonates alcalins, l'ammoniaque ;

3° solubilité des bases dans l'éther.

Très simplement, LÉGER épuise les radicules d'Orge alcalinisées, au moyen d'éther. Les impuretés colorées sont éliminées à l'aide du charbon animal et l'alcaloïde est finalement purifié par recristallisation dans l'alcool.

Vers la même époque, O. GAEBEL (48) extrait l'hordénine des touraillons en épuisant ceux-ci avec de l'alcool à 96°. Après évaporation, le résidu — de réaction acide — est étendu d'eau et filtré. Le liquide est immédiatement alcalinisé avec CO_3K^2 et agité dans une ampoule à décantation :

1° avec de *petites* quantités d'éther uniquement destinées à éliminer la plus grande partie des impuretés colorées;

2° avec de *grandes* quantités d'éther qui s'emparent de l'hordénine. L'auteur constate que dix extractions sont nécessaires pour enlever tout l'alcaloïde.

Nous avons expérimenté cette méthode et constaté : 1° que l'alcool à 96° est d'un titre trop élevé pour effectuer l'épuisement dans de bonnes conditions; 2° que les filtrations de liquides extractifs même dilués sont interminables tandis que les matières insolubles retiennent plus ou moins par adsorption une partie de l'alcaloïde; 3° s'il est exact que certaines impuretés passent dans l'éther plus rapidement que l'hordénine, les pertes sont cependant importantes. Ceci explique la faible teneur trouvée par GAEBEL : 2 ‰, alors que le taux de 5 ‰ est fréquent.

En 1911, Torquato TORQUATI (134), après avoir critiqué la méthode de défécation par l'acétate basique de plomb et la décoloration au moyen du noir animal qui l'une et l'autre entraînent des pertes, adopte une technique d'adsorption à l'aide du plâtre préconisée autrefois par HILGER (72).

Les touraillons, finement divisés, sont acidifiés avec une solution d'acide tartrique et mis à macérer dans l'eau distillée. Les liquides, après filtration, sont évaporés au bain-marie jusqu'à consistance d'extrait mou. Celui-ci est alors additionné de plâtre et, après agitation convenable pour rendre l'ensemble homogène, placé à l'étuve à 60°. Le mélange desséché est épuisé par macération avec de l'alcool fort; la colature évaporée et débarrassée des dernières traces d'alcool est alors lavée avec un peu d'éther; l'extrait alcalinisé par CO_3K^2 est épuisé à l'aide du même solvant. Sept à huit extractions sont nécessaires pour obtenir toute la base. Après évaporation, on transforme la base en sulfate puis alcalinise et extrait à nouveau l'hordénine.

Cette méthode présente en fait les mêmes inconvénients que celles comportant une défécation ou une décoloration par le noir animal. En effet, il est difficile d'empêcher l'adsorbant (plâtre ou autre) de retenir les impuretés et non l'alcaloïde. Les méthodes par adsorption peuvent rendre de grands services dans les recherches d'ordre qualitatif et

il en a été fait un grand usage dans la chimie des vitamines, des hormones et des enzymes. L'adsorption est au contraire à éviter dans les techniques quantitatives.

Nous ferons remarquer qu'en dépit de cette adsorption par le plâtre, l'hordénine de TORQUATI n'est pas très pure puisque plusieurs passages de la base au sulfate et vice versa sont nécessaires. Ajoutons que de telles transformations sont loin d'être quantitatives et l'erreur, dont est entaché le résultat final, n'est même pas prévisible.

Yoshitaka HASHITANI (145) en 1920, dans un travail d'ensemble sur la composition des touraillons, se contente, pour extraire l'hordénine, de faire bouillir à reflux la matière première avec de l'alcool. L'extrait est acidifié par SO^4H^2 et filtré. A ce stade intervient une décoloration à l'aide du charbon animal et, enfin, après alcalinisation par CO^3Na^2 , l'hordénine est extraite à plusieurs reprises au moyen d'éther.

En dernier lieu, R. SEKA (122), dans un article sur l'hordénine paru dans un traité pendant l'exécution de notre travail (1933), indique seulement la méthode de dosage de GAEBEL et suggère, mais sans s'appuyer sur l'expérience, la possibilité d'une purification par sublimation.

A ces quelques essais de dosage de l'hordénine, nous adressons le reproche qu'aucun d'eux n'a fait l'objet d'une étude quantitative serrée. Certes, la plupart des auteurs précédents n'ont en vue que des recherches qualitatives, cependant, TORQUATI étudie l'évolution de l'hordénine au cours de la germination. Or, non seulement ses chiffres présentent une erreur indéterminée, mais cet auteur ayant uniquement envisagé des concentrations par rapport à la matière sèche et celle-ci augmentant au cours du développement de la plantule, les résultats fournis n'autorisent aucune conclusion.

Nous nous sommes donc trouvé dans la nécessité d'établir une technique de dosage aussi précise que possible et dont le degré de précision serait dans tous les cas connu — condition primordiale à l'étude biologique de la substance envisagée. Le souci de la précision dans un dosage s'imposait tout naturellement dans ce laboratoire de chimie biologique de la Faculté des Sciences de Paris où les résultats si importants obtenus par M. Gabriel BERTRAND et ses élèves dérivent en

grande partie de l'extrême précision de techniques d'analyse élémentaire quantitative bien étudiées. Le dosage de certains principes immédiats a également retenu l'attention de M. Gabriel BERTRAND et chacun connaît la méthode aujourd'hui classique de dosage des sucres due à cet auteur. Dans le domaine des alcaloïdes qui nous intéresse ici directement, M. Gabriel BERTRAND (13), dès 1899, proposa une excellente méthode de dosage de ces corps par précipitation au moyen de l'acide silico-tungstique.

Récemment, JANOT et FAUDEMAY (75) ont étudié les propriétés du silicotungstate d'hordénine. C'est un composé se présentant sous forme d'aiguilles jaune chamois dont la solubilité dans l'eau, très faible, est de 0,0065 g pour 100 cm³. Ces auteurs préconisent donc le dosage de l'hordénine au moyen du silicotungstate, mais uniquement dans le cas simple d'un sel pur dissous dans l'eau. Malheureusement, dans un milieu complexe d'origine végétale, l'hordénine n'est pas précipitée seule en milieu acide, et si la précipitation effectuée entre certaines limites de pH permet des séparations, comme l'a montré tout récemment A. DEX (1), nous objecterons qu'ici encore la méthode n'a pas été appliquée à des milieux biologiques.

Néanmoins, nous avons tenté d'utiliser le silicotungstate comme stade intermédiaire d'isolement de l'alcaloïde, mais nous avons été arrêté par le fait que la régénération de l'hordénine à partir du sel ne s'effectue pas quantitativement comme le prouve l'expérience suivante :

0,259 g de silicotungstate d'hordénine, parfaitement pur et desséché à + 105° C. pendant 48 heures, n'ont pu nous fournir après traitement prolongé par la soude, libération de la base par CO² et extraction totale de celle-ci, que 37 mg d'hordénine au lieu de 48 mg prévus par le calcul. Dans d'autres essais le résultat fut encore plus défavorable.

TABLEAU I

Silicotungstate desséché.	Hordénine calculée.	Hordénine trouvée.
grammes	grammes	grammes
0,259	0,048	0,037

(1) Renseignement oral de l'auteur.

II. — PRINCIPE DE L'ÉTABLISSEMENT DE NOTRE MÉTHODE

Ayant renoncé à la méthode par précipitation, il nous restait à reprendre celle de l'extraction de la base en nature, le dosage pouvant se terminer d'une façon pondérale, acidimétrique, ou colorimétrique.

Nous avons repris la méthode de Stass en l'adaptant le mieux possible au cas particulier de l'hordénine.

Dans ce but, un échantillon de touraillons pesant 5 kg a été rendu homogène par trituration et nous a servi exclusivement du commencement à la fin de nos recherches sur le dosage de l'hordénine. Nous avons fait varier les différentes conditions d'expériences jusqu'à obtenir constamment une valeur maxima de la quantité d'hordénine. Pour vérifier que cette teneur maxima trouvée était très voisine de la teneur réelle, nous avons ajouté aux prises d'essais des quantités connues d'hordénine que nous nous sommes efforcé de retrouver.

III. — MATIÈRE PREMIÈRE. — INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE DE DESSICCATION

TORQUATI (134) attribue une grande importance à la température de dessiccation du malt qui précède l'élimination des germes. Plus les germes ont été chauffés à haute température (ce dont on se rend compte par leur coloration plus foncée), plus leur teneur en hordénine, dit cet auteur, est faible : 2,33 ‰ au lieu de 5 ‰ par exemple.

Une différence si importante n'est certainement pas imputable, d'après nous, à la seule température de dessiccation. La température des touraillons, variable avec la qualité du malt à obtenir, est le plus souvent graduellement portée de 50° à 105° à la fin de l'opération pour caraméliser superficiellement le grain et développer l'arôme; cependant, pour les malts de bières pâles, on ne dépasse pas 80°.

Nous faisons l'essai suivant : 10 g de touraillons sont laissés 8 jours à l'étuve à $+ 110^{\circ}$ C. Le tableau suivant (où les chiffres d'hordénine n'ont qu'une valeur relative, seul le dosage comparatif ayant pu être effectué) montre qu'il n'y a pas perte sensible d'hordénine par chauffage :

TABLEAU II

Prise d'essai.	Séjour à l'étuve à $+ 110^{\circ}$ C.	Poids après séjour à l'étuve.	Hordénine.
grammes	jours	grammes	mg
10	8	8,9	57,6
10	Témoin		58

Un deuxième essai se rattachant au précédent est alors exécuté. On sait que la caféine se sublime directement par chauffage dans le vide de grains de café (il s'en volatilise aussi pendant la torréfaction). Nous nous sommes demandé s'il n'en était pas de même pour l'hordénine, cette dernière se sublimant vers $+ 100^{\circ}$ C., sous une pression réduite à moins de 5 mm de mercure. Nous chauffons dans un tube à boule muni d'une allonge conique (voir fig. 3) 2 g de touraillons finement pulvérisés, à la température de $+ 110^{\circ}$ C., maintenue 48 heures; pression : 2 mm de mercure. Aucun sublimat n'apparaît dans l'allonge.

Le dosage d'hordénine nous fournit 12 mg, soit pour 10 g, 60 mg. On voit que l'alcaloïde n'existe pas dans les touraillons sous une forme volatilisable, donc certainement pas à l'état de base libre.

IV. — ÉPUISEMENT DE LA MATIÈRE PREMIÈRE

a) INFLUENCE DE LA PULVÉRISATION.

Dans un essai d'extraction directe par l'éther, deux prises d'essai de 10 g sont au préalable lavées au moyen de ce

solvant puis, après humidification à l'aide d'une solution concentrée de $\text{CO}^3(\text{NH}^4)^2$, elles sont l'une et l'autre desséchées.

L'échantillon 1 est seul pulvérisé avec du sable afin de déchirer les tissus puis les deux échantillons sont épuisés par l'éther dans les mêmes conditions :

TABLEAU III

Échantillon.	Prise d'essai.	Traitement.	Hordénine.
	grammes		mg
1	10	pulv. + sable	20
2	10	non pulv.	32

Dans ce cas, la pulvérisation paraît nuisible.

D'autres essais sont réalisés en épuisant plusieurs lots de 10 g de touraillons par 4 portions de 175 cm³ d'alcool à 85° au bain-marie. L'épuisement est suivi d'une purification de l'extrait acide par 4 traitements à l'éther. Cinq nouveaux traitements, par ce même solvant, de l'extrait alcalinisé par l'ammoniaque assurent l'extraction de l'hordénine.

Les échantillons 1 et 2 sont préalablement pulvérisés et tamisés au tamis n° 50 et l'échantillon 3 au tamis n° 100; les échantillons 4 et 5 ne sont pas pulvérisés :

TABLEAU IV

Échantillon.	Prise d'essai.	Traitement.	Hordénine.
	grammes		mg
1	10	pulv. n° 50	51,4
2	10	»	44,4
3	10	pulv. n° 100	55,6
4	10	non pulv.	61,7
5	10	»	60,2

Il résulte de cette étude que la pulvérisation ne doit pas être effectuée. D'ailleurs, les radicules d'Orge représentent déjà un matériel assez finement divisé.

b) NATURE DU SOLVANT.

Nous avons vu plus haut qu'un essai d'extraction directe de l'hordénine par chauffage dans le vide ne donnait aucun résultat. Il est donc nécessaire d'épuiser la matière première par un solvant. Dans son mémoire, LÉGER (84) dit — très succinctement — avoir extrait l'hordénine par épuisement au moyen d'éther des radicules alcalinisées. Nous avons essayé ce procédé en le faisant précéder parfois d'un dégraisage à l'éther du produit brut.

L'alcool à 85° et l'eau rendue acide au moyen de SO^4H^2 sont également utilisés dans des conditions variées. Voir tableau V.

Avec l'éther comme solvant, on remarque les très mauvais résultats fournis par les appareils à extraction continue. L'alcool, utilisé à plusieurs reprises, fournit des chiffres assez constants (39 à 44 mg) mais l'eau, rendue acide par 0,5 ‰ d'acide sulfurique, se révèle de loin le solvant le plus efficace. De plus, la purification finale par sublimation dans le vide que nous décrivons plus loin est facilitée en raison de la plus faible quantité de stérols extraite par l'eau comparée à celle extraite par l'alcool.

Le choix de SO^4H^2 pour acidifier est également dicté par les nécessités de cette sublimation. Si l'on utilise ClH , la neutralisation ultérieure par l'ammoniaque ou le carbonate d'ammonium, donne naissance à ClNH^4 , lequel accompagne en petite quantité l'hordénine brute en raison des multiples épuisements par l'éther. Lorsque l'on sublime l'hordénine brute, ClNH^4 , volatil, souille le sublimat. Au contraire, avec SO^4H^2 , il se forme $\text{SO}^4 (\text{NH}^4)^2$, sel particulièrement fixe.

V. — CONCENTRATION ET PURIFICATION
DE L'EXTRAIT

De quelque façon qu'ils aient obtenu leur extrait primitif, nous avons vu dans la revue des méthodes de dosage que tous les auteurs, sans exception, effectuaient une filtration. Nous avons constaté que celle-ci ne présentait que des inconvé-

TABLEAU V
Influence de la nature du solvant sur l'extraction de l'hordénine.

Solvant.	Échantillon.	Traitement.	Hordénine.
Ether.....	1	Pas de lavage en milieu acide, 5 extractions à froid.....	mg
	2	— — — — —	34
	3	Lavage en milieu acide, 10 extractions à froid.....	26
	4	— — — — —	34
	5	Extraction continue au Soxhlet pendant 4 heures.....	33
	6	— — — — —	10
	7	Pulvérisation préalable. Extraction continue au Soxhlet pendant 4 heures.....	11
	8	Tourraillons placés dans un nouet suspendu dans l'éther bouillant 4 heures.....	20
Alcool.....	1	6 heures à reflux au B. M. bouillant, alcool à 85°.....	18
	2	— — — — —	33
	3	3 traitements de 4 heures avec 175 cm ³ alcool à 85° à chaque opération.....	32
	4	— — — — —	44
	5	— — — — —	42
	6	— — — — — alcool à 96° à chaque opération.....	39
Eau.....	1	4 traitements de 4 heures avec 100 cm ³ H ₂ O + 0,5 % SO ⁴ H ²	40
	2	— — — — —	51
	3	— — — — —	58
			57

nients en raison de sa lenteur due au colmatage rapide du papier. La filtration ne facilitant même pas les opérations ultérieures, puisqu'une grande partie des substances dissoutes précipitent après concentration, nous l'avons supprimée.

Les liquides aqueux successifs sont décantés dans un ballon de 1 litre et distillés sous pression réduite jusqu'à concentration sirupeuse.

La purification de cet extrait peut alors s'effectuer par défécation ou dégraissage.

a) ESSAIS DE DÉFÉCATION.

Un extrait aqueux rendu légèrement ammoniacal est traité par du sous-acétate de plomb jusqu'à non précipitation. Après filtration, le léger excès de Pb est précipité au moyen de SO_4H_2 . Un second extrait est traité de même, mais sans précipiter l'excès de Pb et un troisième extrait sert de témoin (traitements identiques mais pas de défécation).

TABLEAU VI

Échantillon.	Traitement.	Hordénine.
		mg
1	Défécation et précipitation du Pb.	27
2	Défécation sans précipit. du Pb...	33
3	Témoin	52

La défécation, malgré lavages répétés des précipités, entraîne des pertes et doit être abandonnée.

b) DÉGRAISSAGE.

Le traitement des extraits encore acides par l'éther en vue d'éliminer les graisses fut préconisé la première fois en toxicologie par OTTO (101). TORQUATI, après le traitement au plâtre utilise ce procédé, mais en employant « de petites quantités d'éther ». GAEBEL effectuant ce dégraissage en milieu alcalin aboutit à une perte importante d'hordénine.

Nous avons procédé à une étude systématique du dégraisage au point de vue de la *nature* du solvant et du *nombre* des traitements. Pour des commodités de manipulation et de récupération, on ne peut hésiter qu'entre l'éther de pétrole et l'éther ordinaire.

En raison de la faible solubilité de l'*hordénine-base* dans l'éther de pétrole (environ 1/2000 d'après nos essais) on pourrait songer à effectuer une ultime purification, *même après alcalinisation*. Nous avons cependant constaté que les risques de pertes ne sont pas négligeables et, d'autre part, la fin de l'analyse n'est pas plus aisée.

Nous choisissons donc finalement l'éther sulfurique. Ce dernier doit être au préalable *purifié* et surtout débarrassé de l'alcool éthylique dont il renferme parfois jusqu'à 5 %. L'alcool augmentant beaucoup la solubilité de l'éther dans l'eau, il risque d'entraîner la perte d'une certaine quantité de sel d'alcaloïde insoluble dans l'éther, mais au contraire assez soluble dans la phase légère éther-alcool-eau. Pour effectuer cette purification on agite l'éther ordinaire à 65° B. avec 2 à 3 volumes d'eau distillée dans une grande ampoule à décantation. L'éther est ensuite placé au contact de 1/5 de son poids d'un mélange à parties égales de chaux éteinte et de chlorure de calcium desséché et soigneusement pulvérisé. Après plusieurs agitations, l'éther est décanté dans un flacon où l'on ajoute des râpures ou des fils de sodium. Lorsque tout dégagement gazeux est arrêté, on soumet l'éther à une distillation. Enfin, l'éther anhydre est agité avec une *petite* quantité d'eau distillée, pour le ressaturer de ce liquide. Cette dernière précaution est indispensable si l'on veut éviter de concentrer l'extrait à dégraisser au cours des divers traitements. (Pour éviter toute perte inutile d'éther, l'eau distillée qui, dans ces traitements, sert à saturer d'eau l'éther, se trouvant elle-même saturée d'éther, ressert jusqu'à épuisement).

Lorsque l'on agite le liquide extractif à dégraisser avec de l'éther dans une ampoule à décantation, il se forme fréquemment des émulsions tenaces. Ces dernières sont radicalement évitées en opérant dans des tubes cylindriques tournant sur eux-mêmes (voir description p. 77).

Nous adoptons la proportion de 10 fois plus d'éther que d'extrait à dégraisser. Les précautions prises pour purifier l'éther permettent seules ce lavage énergique. On siphonne la solution éthérée et renouvelle les lavages jusqu'à non coloration de l'éther. Nous ne fixons pas le nombre exact de lavages à effectuer, celui-ci variant d'une analyse à l'autre. Notons toutefois que cette non-coloration s'obtient, suivant les cas, après 4 à 10 lavages.

VI. — EXTRACTION DE L'HORDÉNINE

L'extrait acide, dégraissé, est alcalinisé soit par le carbonate d'ammonium, soit par l'ammoniaque et, dans ce dernier cas, on sature par un courant de gaz carbonique.

Le solvant non miscible à l'eau qui présente le plus d'avantages pour cette extraction est encore l'éther sulfurique. Deux essais tentés l'un avec le chloroforme et l'autre avec l'alcool amylique se sont révélés impraticables. Il ne peut être question d'utiliser l'éther de pétrole en raison de la très faible solubilité de la base dans ce véhicule.

Nous avons essayé l'*extraction continue* dans des appareils du type LORMAND et FAYOLLE, mais l'hordénine n'est pas encore entièrement extraite après 2 jours. De la lenteur de ce passage, due à la solubilité assez grande de l'hordénine dans l'eau (7 ‰) GAEBEL qui conseille 10 extractions et TORQUATI 7 à 8, s'étaient déjà bien rendu compte.

D'autre part l'agitation dans une ampoule à décantation présente plusieurs inconvénients :

1^o malgré toutes les précautions, formation fréquente d'émulsions;

2^o le passage de l'hordénine de l'eau dans l'éther dépend du nombre d'agitations, du renouvellement des surfaces en contact, de l'étendue de celles-ci et enfin de la durée de ce contact.

L'empirisme de la technique précédente nous a conduit à adopter, en le perfectionnant, un procédé d'agitation autrefois utilisé par SCHLOESING puis G. BERTRAND en vue de

l'extraction de la nicotine des jus de tabac. L'appareil dont nous avons vu les vestiges à l'Institut agronomique se compose de tubes de verre cylindriques d'une capacité de 150 cm^3 environ tournant sur deux courroies-supports. Les tubes retenus par des ergots, ne peuvent avancer et roulent sur place. Le dispositif s'anime par tirage à la main des courroies. Le nombre et la vitesse des mouvements de l'opérateur étant variables, les extractions ne sont comparatives qu'entre les tubes mis ensemble sur l'appareil.

Nous avons construit un dispositif analogue, où cet inconvénient est évité; il diffère du type initial :

1° par l'entraînement réalisé au moyen d'un moteur électrique très démultiplié et dont la vitesse est réglable au moyen d'un rhéostat;

2° la capacité des tubes est portée à 650 cm^3 , ces tubes étant gradués à 50, 100, 500, 550 et 600 cm^3 (fig. 1).

Dans ces conditions, rien n'est plus facile que de suivre le passage de l'hordénine de l'eau dans l'éther, puisque : 1° la graduation permet d'observer un rapport constant entre les volumes des deux phases; 2° la vitesse étant réglée de façon à éviter toute émulsion, le temps demeure la seule variable dont il est alors facile d'étudier l'influence.

Dans nos tubes, les surfaces sont renouvelées par la rotation d'une double manière :

1° par la rotation de la couche aqueuse sur elle-même (fig. 2, A);

2° par entraînement le long de la paroi de verre d'une mince couche adhérente (fig. 2, B).

Les grandes surfaces de contact ainsi développées sont perpétuellement renouvelées et permettent d'atteindre dans le minimum de temps et sans émulsion l'équilibre du partage de l'hordénine entre les deux solvants.

Après une extraction, les tubes sont abandonnés quelques minutes dans la position verticale pour assurer la séparation franche des deux couches; l'éther est alors siphonné à l'aide d'un tube de verre recourbé et amorcé avec de l'éther à l'aide d'une pissette emplie de ce solvant.

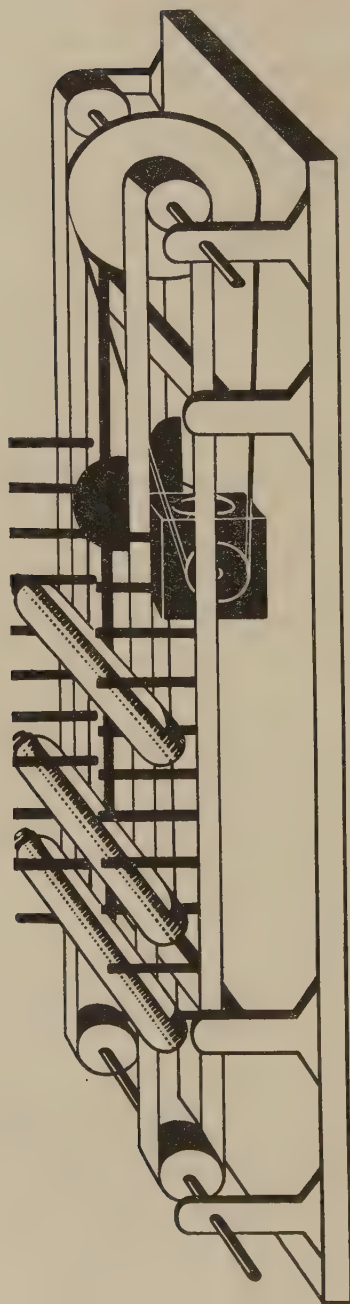


FIG. 1. — Appareil à extraction.

Un autre avantage du procédé est que l'extrait aqueux une fois placé dans le tube y demeure jusqu'à la fin de l'analyse : le dégraissage par l'éther en milieu acide, l'alca-

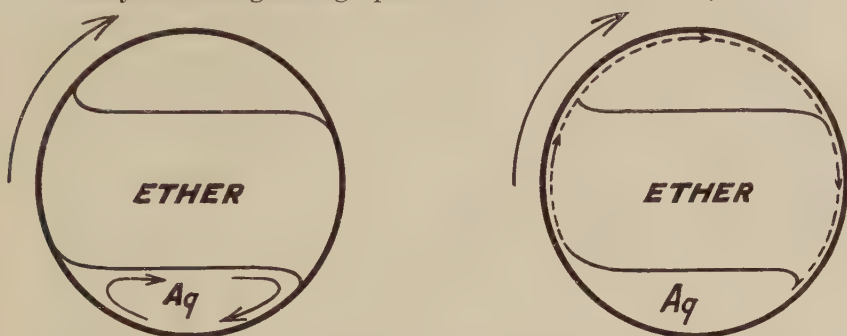


FIG. 2, A et B. — Schéma montrant les deux modes principaux de renouvellement des surfaces dans les tubes à extraction.

linisation, l'extraction de l'hordénine se font *sans transvasement*.

Le tableau VII indique les quantités d'hordénine obtenues à partir d'extraits aqueux identiques en faisant varier le rapport des volumes et le nombre des renouvellements de l'éther. La rotation est à chaque fois maintenue pendant $3/4$ d'heure et, en tenant compte du temps nécessaire à la séparation des couches et au siphonnage, on peut estimer à 1 heure le temps suffisant pour chaque opération. (Expérience 5, contact de 1 heure : 17,1 mg et expérience 6, contact de 2 heures : 17,6 mg).

TABLEAU VII

Expérience.	Rapport $\frac{V \text{ éther}}{V \text{ aqueux.}}$	Nombre d'extractions	Hordénine.
			mg
1	5	10	42,4
2	10	5	56,6
		5	7,3
3	10	5	57,6
		5	6,8
4	10	5	57,7
		5	7
5	10	1	17,1
6	10	1	17,6

L'expérience 1 montre que le rapport 5 est insuffisant pour extraire toute l'hordénine en 10 fois, de même le rapport 10 en 5 fois. Par contre le rapport 10 répété 10 fois donne de bons résultats : 63,9, 64,4, 64,7 et, à partir de ce moment, 3 nouvelles extractions effectuées sur les expériences 2 et 3 ne donnent que des résidus pesant moins de 1 mg et ne présentant que très faiblement les réactions de l'hordénine.

En raison de la longueur de ces extractions multiples, nous nous sommes demandé si l'application de la loi de BERTHELOT et JUNGFLAISCH (11) sur le partage d'un corps entre deux solvants non miscibles ne nous permettrait pas d'abrégier les opérations. Faisons remarquer que cette loi s'applique au cas d'un corps pur se répartissant dans des solvants également purs. Nous allons voir si l'on peut l'appliquer en milieu complexe.

La loi de BERTHELOT et JUNGFLAISCH peut s'exprimer comme suit : lorsqu'on agite une solution d'un corps avec un deuxième solvant non miscible avec le premier, la substance primitive se partage entre les deux dissolvants et le rapport des concentrations du corps dissous dans les deux solutions est constant (ce rapport est le coefficient de partage).

Soit x la quantité d'hordénine dissoute dans V cm³ d'eau que l'on agite avec V_1 cm³ d'éther. Après équilibre du partage, il reste x_1 d'hordénine dans l'eau et $x - x_1$ est passé dans l'éther.

La loi précédente s'exprime alors par l'équation :

$$(1) \quad \frac{x_1}{V} = \frac{x - x_1}{V_1} \cdot K, \text{ K étant le coefficient de partage.}$$

Si l'on fait sur le même extrait aqueux une seconde extraction avec le même volume V_1 d'éther, il reste, après équilibre, une quantité x_2 d'hordénine dans la phase aqueuse et l'on peut écrire :

$$(2) \quad \frac{x_2}{V} = \frac{x_1 - x_2}{V_1} \cdot K$$

Les grandeurs connues sont ici les quantités d'hordénine extraites que l'on peut peser, c'est-à-dire :

après la première extraction : $a = x - x_1$ (3)
 et après la seconde extraction : $b = x_1 - x_2$

En faisant le rapport des équations (1) et (2), V et V_1 disparaissent ainsi que K. On a :

$$\frac{x_1}{x_2} = \frac{x - x_1}{x_1 - x_2} \text{ ce qui peut s'écrire en tenant compte de (3) :}$$

$$\frac{x_1}{x_2} = \frac{a}{b} \text{ (4) or, } x_2 = x_1 - b \text{ et (4) devient :}$$

$$\frac{x_1}{x_1 - b} = \frac{a}{b} \text{ d'où } x_1 = \frac{ab}{a - b}$$

$$\text{et } x = a + x_1 = a + \frac{ab}{a - b} \text{ (5).}$$

On voit qu'au moyen de deux extractions successives, suivies de pesées séparées, on pourrait connaître la quantité totale d'hordénine contenue dans l'extrait aqueux si le coefficient de partage K était bien constant, c'est-à-dire si l'extraction en milieu complexe suivait bien la loi de BERTHELOT et JUNGFLAISCH.

De l'équation (1) on tire :

$$K = \frac{x_1}{V} \cdot \frac{V_1}{x - x_1} \text{ (6)}$$

En remplaçant x et x_1 par leurs valeurs en fonction de a et b tirées des équations (3) et (5) on a :

$$K = \frac{ab}{a - b} \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{V_1}{a} \text{ (7)}$$

Dans l'exemple suivant, pour calculer K, on pèse l'hordénine extraite après la première extraction, après la seconde et après huit autres extractions bloquées ensemble :

TABLEAU VIII

Expérience.	Extraction.	Hordénine.
		mg
1	1	17
	2	8,6
	3 + 4 + 5 + 6 + 7 + 8	38,4

$$a = 17; b = 8,6 \text{ et } \frac{V_1}{V} = 10$$

$$\text{d'où } K = \frac{17 \times 8,6}{17 - 8,6} \times 10 \times \frac{1}{17} = \frac{1462}{142,8}, \text{ voisin de } 10$$

Mais si l'on poursuit l'extraction totale, on peut connaître la quantité d'hordénine x préexistante dans l'extract aqueux, ici 64 mg : ceci permet de calculer à nouveau K en appliquant directement l'équation (6).

$$x_1 = 64 - 17 = 47$$

$$x = 64 \quad \text{et } K = \frac{47}{1} \times \frac{10}{64 - 47} = \frac{470}{17} = 27$$

On voit que dans une même analyse, le partage de l'hordénine au cours des diverses extractions ne suit pas la loi en question puisque le coefficient de partage K , au lieu d'être constant, peut varier de 10 à 27. Nous en concluons que la solubilité de l'hordénine dans les deux phases est affectée par la présence d'impuretés solubles dans ces solvants.

En appliquant le même raisonnement à d'autres expériences nous avons trouvé des valeurs de K indiquées dans le tableau suivant où K_1 est le coefficient de partage calculé pour la première extraction et K_{1-n} pour l'ensemble de toutes les extractions :

TABLEAU IX

Expérience.	Extraction	Hordénine.	K_1	K_{1-n}
		mg		
1	1	17	10	27
	2	8,6		
	3+4+...+8	38,4		
2	1	19	7,2	22,5
	2	8		
	3+4+...+8	35		
3	1	18,5	5,4	6,2
	2	6,5		
	3+4+...+8	5		

L'expérience 3 a été effectuée exceptionnellement sur des touraillons d'origine différente. On voit que ce que l'on pourrait appeler coefficient *pratique* de partage de l'hordénine — d'ailleurs défavorable — ne présente pas une fixité suffisante dans une même expérience pour éviter l'extraction totale. Malgré la durée des opérations, nous avons fixé à 10 le nombre d'extractions par l'éther en milieu alcalin en utilisant à chaque fois un volume d'éther dix fois plus grand que celui du liquide aqueux à épuiser.

De nombreux auteurs conseillent, lorsque l'on exécute des extractions par l'éther, de *dessécher* celui-ci sur SO^4Na^2 anhydre par exemple, avant d'effectuer la concentration par distillation. Cette technique qui a l'avantage d'éliminer avec l'eau dissoute dans l'éther certaines substances passées en solution dans ce véhicule doit être rejetée dans une extraction quantitative. Dans les exemples suivants la perte d'hordénine atteint en effet 18 % :

TABLEAU X

Expérience.	Traitement.	Hordénine.
1	témoin	mg 63
2	+ SO^4Na^2 anh.	54,6
3	»	53,3

Le sulfate de sodium *retient* l'alcaloïde en partie, comme le prouve l'expérience suivante : SO^4Na^2 ayant servi à la dessiccation de l'éther dans l'expérience 3 est agité 8 heures au moulinet avec de l'éther anhydre : après évaporation, on retrouve 3,9 mg d'hordénine.

Nous avons, d'ailleurs, essayé divers desséchants et avons observé des pertes pouvant aller jusqu'à 64 %. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant (on part ici de quantités connues d'hordénine dissoutes dans l'éther) :

TABLEAU XI

Hordénine au départ.	Desséchant.	Hordénine retrouvée.	Perte %.
mg		mg	
23,2	10 g Cl^2Ca	19,5	15
21,4	10 g Cl^2Ca + chaux éteinte	17,0	20
21,0	10 g SO^4Na^2 anhydre	16,8	20
24,0	10 g SO^4Mg anhydre	10,4	56
24,7	10 g SO^4Cu anhydre	8,9	64

VII. — PURIFICATION FINALE DE L'HORDÉNINE

La plupart des auteurs utilisent pour obtenir un produit pur la décoloration par le noir animal. Nous faisons, à cette méthode, deux reproches :

1° la décoloration n'est jamais que partielle;

2° au point de vue quantitatif, les pertes par adsorption ne sont pas négligeables, comme le prouvent les deux expériences suivantes :

a) Deux dosages sont exécutés parallèlement, l'un étant terminé par la méthode de sublimation décrite plus loin et l'autre par la décoloration au moyen du noir animal :

TABLEAU XII

Expérience.	Technique.	Hordénine.	Perte.
		mg	
1	sublimation	65,1	—
2	noir animal	53	18 %

Encore faut-il noter que l'hordénine de l'analyse n° 2 présente une légère teinte jaune malgré deux traitements par le noir animal suivis de plusieurs lavages du noir par l'alcool dans le but de réduire les pertes au minimum.

b) Comme dans le cas de la dessiccation de l'éther, nous nous rendons compte de l'adsorption de l'alcaloïde par le noir animal en agitant celui-ci avec une solution alcoolique d'hordénine.

48 mg d'hordénine dissous dans 100 cm³ d'alcool à 90° sont agités avec 3 g de noir purifié, pendant 5 minutes; on

filtre et évapore l'alcool puis on délaye le noir dans 25 cm³ d'alcool à 90° à deux reprises ; on pèse à chaque fois l'hordénine obtenue :

TABLEAU XIII

Traitement.	Volume d'alcool.	Hordénine.	Perte.
1 ^{re} évaporation	100 cm ³	38 mg	20 %
2 ^e —	25 cm ³	4 mg	12 %
3 ^e —	25 cm ³	1 mg	10 %

Sur 48 mg on n'en retrouve finalement que 43, soit une perte de près de 10 %.

Nous avons alors pensé à utiliser une propriété de l'hordénine signalée par LÉGER et d'autres auteurs : la facile *volatilisation* de l'alcaloïde quand on le maintient à la température de fusion.

Si l'on opère à l'air libre, sous la pression ordinaire, il est facile de constater qu'il reste un léger résidu goudronneux à partir de l'hordénine la plus pure. Pour éviter cette perte, due semble-t-il à une oxydation, nous opérons dans le vide ce qui permet aussi d'abaisser la température.

Description de l'appareil utilisé. — Nous opérons dans un petit tube à boule de 10 cm³ muni d'une allonge conique (fig. 3). L'ensemble, disposé horizontalement, est

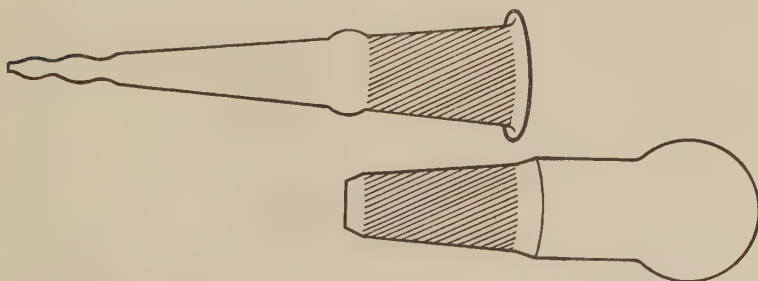


FIG. 3. — Tube à boule et allonge conique pour distillation sous pression réduite.

mis en relation avec une pompe à bain d'huile par l'intermédiaire d'un flacon de 2 litres jouant le rôle de volant de vide. La boule du tube est chauffée dans une petite étuve

électrique dont on peut faire varier la température de $+ 50$ à $+ 350^{\circ}$ C. à l'aide d'un rhéostat. Cette étuve, bien calorifugée, permet d'obtenir une température rigoureusement constante à $\mp 1^{\circ}$ près. L'air extérieur et un filet d'eau froide refroidissent l'allonge. La pompe permet d'obtenir une pression réduite à 2 ou 3/10 de mm de mercure. L'appareil est suffisamment étanche pour que, après interruption du fonctionnement de la pompe, la pression ne s'élève pas après 12 heures à plus de 5 mm de mercure. L'allonge conique de l'appareil d'un poids d'environ 20 g peut être pesée avant et après sublimation sur les balances habituelles, sensibles au 1/10 de mg; la différence donne immédiatement le poids du sublimat.

Avec cet appareil il fallait établir :

1^o les conditions de sublimation sans perte de l'hordénine pure;

2^o celle de la sublimation en présence d'impuretés.

1^o Lorsque l'on chauffe dans l'appareil précédemment décrit de l'hordénine *pure*, sous une pression réduite à 1 mm de mercure environ, on constate qu'elle commence à se sublimer lentement dès 80° . A 100° , la sublimation de quantités de l'ordre de 20 à 50 mg est totale en six heures. Si l'hordénine initiale est bien pure, il n'y a pas de perte.

Nous le vérifions ci-dessous sur trois types d'échantillons d'hordénine :

a) la base isolée à partir d'un sulfate de synthèse;

b) la base obtenue par nous à partir des touraillons et purifiée par de nombreuses cristallisations dans l'alcool et dans l'eau;

c) la base précédente déjà sublimée une fois.

Voici les résultats obtenus :

TABLEAU XIV

Echantillon.	Prise d'essai.	Quantité retrouvée.
	mg	mg
<i>a</i>	13,5	13,5
<i>b</i>	22	21,6
	31,8	31,7
<i>c</i>	44,5	44,5

On remarque que l'hordénine des échantillons *b* provenant des recristallisations donne encore une petite perte à la première sublimation; par contre, la seconde sublimation (échantillon *c*) ne provoque plus de variation de poids.

2° L'hordénine, en présence de *diverses impuretés*, se trouve tout entière dans le résidu de la concentration des extraits étherés en milieu alcalin; ce résidu se présente sous forme d'une huile jaune brun où l'hordénine cristallise à la longue.

Nous arrêtons la concentration précédente quand le volume n'est plus que de 5 à 6 cm³ et transvasons alors dans le tube à boule de l'appareil en ayant soin de laver le ballon à 2 reprises avec 2 cm³ d'éther. Nous distillons à sec la solution étherée, en plaçant le tube à boule dans une petite étuve électrique réglée à + 40° C. (fig. 4) (1).

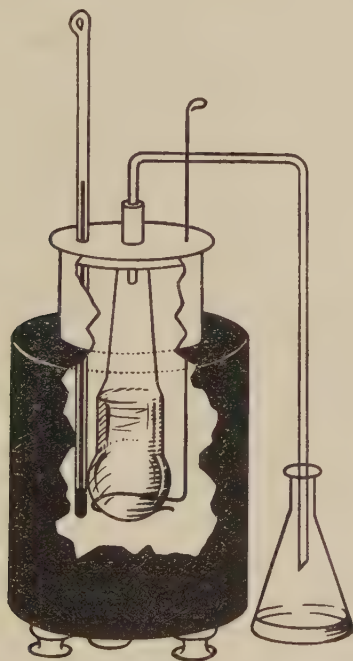


FIG. 4. — Étuve électrique pour la distillation de l'éther dans le tube à boule.

(1) Il est nécessaire de *distiller*, au lieu d'évaporer à l'air libre, pour éviter que le produit ne grimpe le long des parois du tube.

Le résidu est alors desséché dans le vide, au-dessus de SO^4H^2 , à température ordinaire.

Nous avons signalé au cours de diverses manipulations décrites antérieurement que certaines particularités avaient été introduites dans la technique de dosage en raison de la sublimation. Rappelons les principales : acidification de l'eau des premiers épuisements par SO^4H^2 de façon à obtenir, après alcalinisation par NH^3 ou $\text{CO}^3(\text{NH}^4)^2$, $\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2$, sel fixe ne pouvant souiller l'hordénine; substitution de l'eau à l'alcool qui dissout moins de stérols (ces derniers se sublimant à partir de $+ 130\text{-}140^\circ \text{C}$. peuvent être entraînés, à plus basse température, par l'hordénine); enfin nombreux lavages, par l'éther en milieu acide, destinés à éliminer le plus possible de substances étrangères.

Nous adoptons la température de $+ 105^\circ \text{C}$. pour cette sublimation, une température inférieure entraînant une durée excessive de l'opération et une température supérieure, des risques d'entraînement de stérols.

L'étude de la *durée* de l'opération est résumée dans le tableau XV :

TABLEAU XV

Expérience.	Température.	Durée.	Hordénine.
			mg
1	+ 105°C	12 h.	44,5
	»	12 h. supplém.	0,7
2	+ 105°C	12 h.	64,1
	+ 140°C	2 h. supplém.	0,3

Les sublimations d'extraits sont conduites en deux temps :

1° on condense à l'emplacement du rodage, c'est-à-dire encore dans le tube à boule;

2° on repousse le premier sublimat dans l'allonge conique, ce qui permet une purification supplémentaire. Pour une durée totale de 12 heures, les deux opérations sont chacune de 6 heures.

L'hordénine, ainsi sublimée, est parfaitement incolore et fond d'emblée à $+ 118^\circ \text{C}$.

Pour vérifier s'il n'y a pas perte d'hordénine par sublimation en présence des impuretés l'accompagnant dans l'extrait, nous séparons en deux fractions de 10 cm³ la solution étherée finale concentrée à 20 cm³. L'une des portions est additionnée d'hordénine pure et les dosages sont terminés parallèlement. L'hordénine ajoutée se retrouve à moins de 1/2 % près :

TABLEAU XVI

Prise d'essai.	Hordénine trouvée.	Hordénine calculée.
10 cm ³ solution étherée	mg 31,8	mg
10 cm ³ solution étherée + 16,3 mg	47,8	48,1

Pourrait-on terminer le dosage autrement que par pesée de l'alcaloïde en nature après sublimation?

Le dosage acidimétrique en raison des petites quantités mises en œuvre n'est pas possible. La colorimétrie (réaction de MILLON ou réaction de DENIGÈS-LABAT) a l'inconvénient de n'être pas spécifique. Elle ne peut être effectuée que sur le produit complètement purifié et se présente ainsi comme une opération supplémentaire inutile.

L'avantage de la sublimation est donc de terminer le dosage par une opération dont les conditions physiques sont spécifiques du corps à doser. On vérifie aisément la pureté de l'hordénine par son point de fusion et la technique de dosage est, de ce fait et sans aucune modification, une technique de *recherche* de l'alcaloïde.

VIII. — VÉRIFICATION DE L'ENSEMBLE DE NOTRE MÉTHODE

Dans le but de nous assurer qu'aucun stade du dosage ne provoque de destruction d'hordénine, ni n'en laisse échapper, nous vérifions que, pour deux prises d'essai traitées parallèlement, nous pouvons retrouver une quantité connue de base ajoutée dès le début à l'une d'elles,

TABLEAU XVII

Expérience	Hordénine ajoutée.	Hordénine trouvée.	Quantité retrouvée.	Perte.
1	mg	mg	mg	
	0	42,5		
	36,4	78,6	36,1	0,9 %
2	0	57,6		
	18	75,2	17,5	2,2 %
3	0	65,1		
	19,1	84,1	19	0,5 %

IX. — DÉTERMINATION DE L'ERREUR

Deux sortes d'erreurs peuvent entacher le résultat :

a) une erreur systématique par défaut qui ne dépasse pas 2 % si l'on observe toutes les précautions énumérées plus haut;

b) une erreur par excès si le produit obtenu n'est pas rigoureusement pur. Dans ce cas, averti par l'abaissement du point de fusion, on redissout le sublimat et recommence une ou deux sublimations. Sauf très rares exceptions, nous n'avons pas dû effectuer cette purification supplémentaire; dans des cas limites, nous avons fait cette purification et obtenu des résultats identiques à 2 % près.

Nous considérons donc les chiffres fournis par notre méthode de dosage comme entachés d'une erreur relative de ± 2 %.

X. — RÉSUMÉ DE LA TECHNIQUE

a) ÉPUISEMENT DE LA MATIÈRE PREMIÈRE

10 g de radicules sont épuisés par 5 portions de 100 cm³ d'eau rendue acide par 0,5 ‰ de SO⁴H². On laisse digérer, chaque fois une demi-heure au bain-marie bouillant, l'ensemble contenu dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant. On agite de temps en temps.

b) CONCENTRATION ET PURIFICATION DE L'EXTRAIT

On concentre par distillation sous pression réduite jusqu'à résidu de 30 à 40 cm³ que l'on transvase dans un tube cylindrique d'une capacité de 650 cm³. Après addition d'un volume d'éther (préalablement privé d'alcool et saturé d'eau) égal à 10 fois celui de l'extrait, le tube bien bouché est placé dans l'agitateur par rotation décrit plus haut (fig. 1). Après 3/4 d'heure, le tube est abandonné verticalement et dès que les couches sont bien séparées, on siphonne l'éther. On renouvelle les lavages jusqu'à non-coloration de celui-ci (5 à 6 lavages sont généralement nécessaires).

c) EXTRACTION DE L'HORDÉNINE

On alcalinise l'extrait par $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ ou par NH_3 (dans ce cas on sature de CO_2); on effectue 10 épuisements par l'éther exactement dans les mêmes conditions que les lavages.

Les solutions éthérées sont distillées par fractions dans un ballon de 250 cm³ au B. M. électrique et l'on concentre finalement jusqu'à résidu de 5 à 6 cm³ pour effectuer le transvasement dans le tube à boule. On rince le ballon avec 2 portions de 2 cm³ d'éther. On distille à sec le contenu du tube à boule et dessèche l'extrait obtenu par un séjour de 12 heures dans le vide sur l'acide sulfurique.

d) PURIFICATION DE L'HORDÉNINE ET PESÉE

La sublimation s'effectue à $+ 105^\circ \text{C}$ pendant 12 heures en ayant soin de déplacer, dans un premier temps, l'hordénine de la boule dans le rodage, et, dans un second temps, du rodage dans l'allonge conique.

La différence des poids de l'allonge avant et après sublimation (et dessiccation convenable) fournit la quantité d'hordénine de 10 g de radicelles; pourcentage $P = p \times 10$.

On vérifie sur le sublimat les propriétés de l'hordénine ($F: + 117.8^\circ \text{C}$. et différentes réactions chimiques).

CHAPITRE II

DOSAGE DE LA TYROSINE

La plupart des méthodes existantes ont trait au dosage de la tyrosine, non dans des matières premières végétales ou autres, mais dans les matières protidiques préalablement isolées.

I. — REVUE CRITIQUE DES MÉTHODES ANTÉRIEURES

Le dosage de la tyrosine a donné lieu à de nombreuses publications, en raison des réactions colorées très sensibles que peut donner cette substance :

1^o réaction indiquée en 1849 par MILLON ;

2^o réaction xantho-protéique ;

3^o réaction de O. FOLIN à l'aide du réactif phosphotungstomolybdique.

Il est à remarquer en premier lieu que le tryptophane fournit avec ces réactifs des colorations ou des précipités qui rendent son élimination nécessaire. Or, l'élimination de ce corps dans les liquides d'hydrolyse se fait toujours par le nitrate mercurique (THOMAS, 131) ou le sulfate mercurique. Le mercure doit être éliminé dans toutes les méthodes autres que celles utilisant la réaction de MILLON où il est au contraire utile.

La réaction *xantho-protéique* présente de grandes variations avec le pH et la technique de J. TILLMANN, P. HIRSCH et F. STOPPEL (133), technique la mieux mise au point utilisant cette réaction, présente de nombreuses difficultés. Les conditions de l'hydrolyse initiale sont mal précisées et les calculs sont très compliqués, les auteurs voulant doser sans séparation préalable le tryptophane et la tyrosine en se basant uniquement sur les différences de l'intensité de la réaction à deux pH différents, l'un acide, l'autre alcalin,

La réaction de O. FOLIN et W. DENIS (45) utilise la coloration bleue qui prend naissance lorsque l'on met en présence la tyrosine ou le tryptophane avec un réactif phosphomolybdotungstique. Initialement, la méthode donnait des chiffres trop élevés dus au tryptophane dont on ignorait l'action. Des substances réductrices variées, dont on ne peut jamais, en milieu complexe, affirmer l'absence peuvent aussi agir sur le réactif. Pour cette raison, la méthode critiquée par P. THOMAS (131) fut reprise par O. FOLIN et J. M. LOONEY (46) dans le but de préciser le rôle du tryptophane.

C'est finalement à une hydrolyse préalable de la matière protidique par la soude, suivie de la réaction de MILLON, que revient O. FOLIN en collaboration avec V. CIOCALTEU (44); la même technique est appliquée à de petites prises d'essai sous forme de microméthode par O. FOLIN et A. D. MARENZI (47).

Ayant à doser la tyrosine et le tryptophane de farines végétales et non plus de matières protidiques préalablement isolées, Mac FARLANE et FULMER (94) estiment que l'hydrolyse acide ou alcaline conduit, après avoir effectué la réaction de MILLON, à des colorations non exclusivement imputables à la tyrosine et ils conseillent de faire une hydrolyse diastatique. Cette méthode a l'inconvénient d'introduire sous forme de diastase une certaine quantité des amino-acides à doser, d'où la nécessité d'effectuer une opération parallèle sur une quantité connue de tyrosine. Cette substitution des diastases à la soude, vis-à-vis de laquelle la tyrosine est très stable, ne nous paraît donc pas avantageuse.

Il a parfois été préconisé d'effectuer la réaction de MILLON directement sur des matières protidiques, sans hydrolyse préalable, comme dans la technique de ZUWERKALOW (146). La substance protidique, en solution, est chauffée en présence de CH^3COOH , de SO^4Hg et de NO^2Na . Il semble bien qu'en raison du milieu très acide, l'hydrolyse a quand même lieu et que la réaction de MILLON se fasse sur la tyrosine ainsi libérée. L'inconvénient d'une telle méthode est de présenter une évolution de réaction longue et incertaine; nous l'avons constaté personnellement en opérant sur de l'édestine et de la légumine pures.

En présence de ces différentes techniques, nous avons choisi celle de O. FOLIN et V. CIOCALTEU (84) mais en précisant les modalités d'application dans le but du seul dosage de la tyrosine dans les radicules d'Orge. Les précisions apportées sont, nous allons le voir, de deux ordres : les unes d'application d'ordre général auront avantage à être appliquées dans tous les dosages similaires; les autres, plus empiriques, ne seront valables que dans le cas particulier de notre dosage.

Comme pour le dosage de l'hordénine, nous nous sommes astreint à vérifier cette technique par la méthode des quantités ajoutées.

Quelle interprétation donne-t-on de la réaction de MILLON dont il va être continuellement question dans l'étude qui suit? Le réactif initial, dit de MILLON, s'obtient en dissolvant du mercure dans l'acide azotique; cette solution renferme un mélange de nitrate mercurieux et de nitrate mercurique. On s'aperçut bientôt que le premier de ces sels jouait un rôle essentiel. GIBBS (52) montra qu'il se formait par action de l'acide nitreux sur la tyrosine et les monophénols en général, un nitrosophénol coloré en rouge dont la formation était catalysée par les sels de mercure.

II. — MÉTHODE INITIALE DE O. FOLIN ET V. CIOCALTEU

Elle comprend 3 temps :

- 1^o hydrolyse de la matière protidique;
- 2^o séparation du tryptophane;
- 3^o dosage colorimétrique de la tyrosine.

1^o HYDROLYSE DE LA MATIÈRE PROTIDIQUE.

Dans un ballon de KJELDAHL sec de 250 cm³ on place :

- 1 g de matière protidique sèche;
- 2 cm³ d'alcool butylique;
- 1 spirale de fil d'argent;
- 4 g de soude sous forme d'une solution à 20 %.

On fait bouillir à reflux, doucement, pendant 18 à 20 heures. Sans arrêter le chauffage, on ajoute 10 cm³ d'eau

et fait bouillir 10 minutes sans réfrigérant pour éliminer l'alcool butylique. On cesse alors de chauffer et ajoute à la pipette, goutte à goutte, dans la solution chaude 10 cm³ de SO⁴H² 14 N.

On agite énergiquement et refroidit; on ajoute à nouveau 5 cm³ de SO⁴H² 14 N, transvase le tout dans une fiole jaugée de 100 cm³, complète avec les eaux de lavage et de l'eau distillée puis on filtre. On recueille environ 60 cm³ que l'on conserve à l'obscurité et au frais.

2° SÉPARATION DU TRYPTOPHANE.

Dans un tube à centrifuger de 15 cm³, on introduit 8 cm³ d'hydrolysats protidiques.

On fait tomber goutte à goutte, d'une hauteur de 3 cm, 4 cm³ d'une solution à 15 % de SO⁴Hg dans SO⁴H² 6 N. L'agitation est inutile.

On décante le liquide surnageant dans une fiole graduée de 100 cm³ et rince le bord du tube avec 2 cm³ de SO⁴H² 0,1 N.

On ajoute au sédiment 10 cm³ d'une solution à 1,5 % de SO⁴Hg dans SO⁴H² 2 N, agite à l'aide d'un petit agitateur et abandonne 10 minutes. On rince à nouveau l'agitateur avec 2 cm³ SO⁴H² 0,1 N. On centrifuge, transvase dans la fiole de 100 cm³ et rince le bord comme précédemment.

3° DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DE LA TYROSINE PAR LA RÉACTION DE MILLON.

On prépare un étalon en mettant dans une fiole jaugée de 100 cm³, 5 cm³ d'une solution-étalon de tyrosine dans SO⁴H² 2 N et renfermant 1 mg de tyrosine par cm³.

On ajoute successivement 4 cm³ de solution de SO⁴Hg à 15 %, 12 cm³ de solution de SO⁴Hg à 1,5 % puis 7 cm³ de SO⁴H² 0,1 N.

A cette solution et à celle provenant du traitement de l'hydrolysats protidiques, on ajoute 6 cm³ de SO⁴H² 7 N (toutes ces additions de SO⁴H² ont été calculées en vue d'établir une acidité finale environ normale quand le volume du ballon est complété à 100 cm³).

On chauffe les ballons 15 minutes dans l'eau bouillante puis refroidit aussitôt à température ordinaire. On ajoute 1 cm³ d'une solution de nitrite de sodium à 2 % en agitant, puis complète le volume à 100 cm³. On fait aussitôt la comparaison.

Si l'étalon est à 20 mm et si on lit n mm par ailleurs, on a : p % de tyrosine $= \frac{20}{n} \times 1,25 \times 5$.

La préparation des solutions de sulfate mercurique doit s'effectuer comme suit :

Solution à 15 % : 30 g du sel sont placés dans une fiole graduée de 200 cm³ en s'aidant de 80 à 90 cm³ de SO⁴H² 7 N. On ajoute 31 cm³ d'eau et agite jusqu'à solution totale. On complète avec SO⁴H² 7 N. Après quelque temps, on filtre.

Solution à 1,5 % : à 10 cm³ de la solution précédente, on ajoute 10 cm³ SO⁴H² 14 N et complète à 100 cm³ avec de l'eau distillée.

III. — MATÉRIEL A ANALYSER TRAITEMENTS PRÉALABLES

Le matériel comprend les malts et les germes, ces derniers servant aussi à doser l'hordénine à différents stades de leur développement. Pour les échantillons correspondants à une germination d'au moins 4 jours, les quantités de matières premières sont assez considérables. Il n'en va pas de même pour l'échantillon âgé de deux jours dont nous ne disposons que de 2 à 3 g.

O. FOLIN et V. CIOCALTEU partent de 1 g de *matière protidique*, mais O. FOLIN et A. M. MARENZI n'utilisent que 0,10 g dans leur microméthode.

Nous avons reconnu qu'en partant de 1 g de nos germes, on obtient 4 à 10 mg de tyrosine et, dans la prise d'essai où l'on fait la réaction de MILLON, 12 fois moins : soit 0,33 à 0,83 mg. Ces quantités donnent des intensités de coloration très satisfaisantes pour la méthode d'évaluation envisagée plus loin.

Une première difficulté vient de ce que les germes renferment de l'hordénine, monophénol donnant, comme la

tyrosine, la réaction de MILLON; elle doit donc être éliminée ainsi que la tyramine éventuelle. De plus, les lipides, stérols et pigments variés ne peuvent que gêner. Pour nous débarrasser de ces substances, nous soumettons les germes finement pulvérisés (1) à un épuisement prolongé de 6 heures avec de l'alcool à 90°, en opérant comme suit (voir fig. 5) :

1 g de poudre fine de germes est placé dans une petite cartouche *c* obtenue en roulant du papier filtre dont on replie une extrémité. La cartouche est disposée dans un tube de verre *t* légèrement étiré et fermé par une membrane filtrante faite de coton de verre supportant de l'amiante peu tassée. Tube et cartouche sont maintenus dans le col d'un ballon de 250 cm³ au moyen de pointes rentrantes *p*, pratiquées sur ce col. L'ensemble est surmonté d'un réfrigérant *r*. On place dans le ballon 50 cm³ d'alcool à 90° et chauffe au bain-marie, en réglant la température de celui-ci de façon à ce que la condensation de l'alcool soit telle que la poudre contenue dans la cartouche soit toujours recouverte. Dans ces conditions, l'épuisement est continu et d'une efficacité comparable à celle obtenue dans les appareils du type KUMAGAWA.

Après 4 heures d'un tel traitement, l'alcool ne dissout plus rien. On remplace alors l'alcool du ballon par de l'éther, dispose le tout sur un bain-marie électrique et pratique un épuisement de 3 heures dans les mêmes conditions que précédemment.

Ces traitements préalables sont indispensables. En effet, un échantillon (n° 7) contenant par gramme 9 mg de tyrosine, chiffre provenant de la moyenne de quatre dosages, s'il n'a pas subi les traitements précédents, donne à l'analyse 14,45 mg pour 1 g (moyenne de 3 dosages). Or, cet échantillon renferme seulement 1,25 % d'hordénine; cette proportion ne suffit pas à expliquer une telle différence. Le tableau XVIII résume cette vérification :

(1) La pulvérisation préalable est ici indispensable en vue de l'hydrolyse ultérieure; on ne peut pulvériser après l'épuisement en raison des pertes inévitables sur les petites quantités mises en jeu (< 1g).

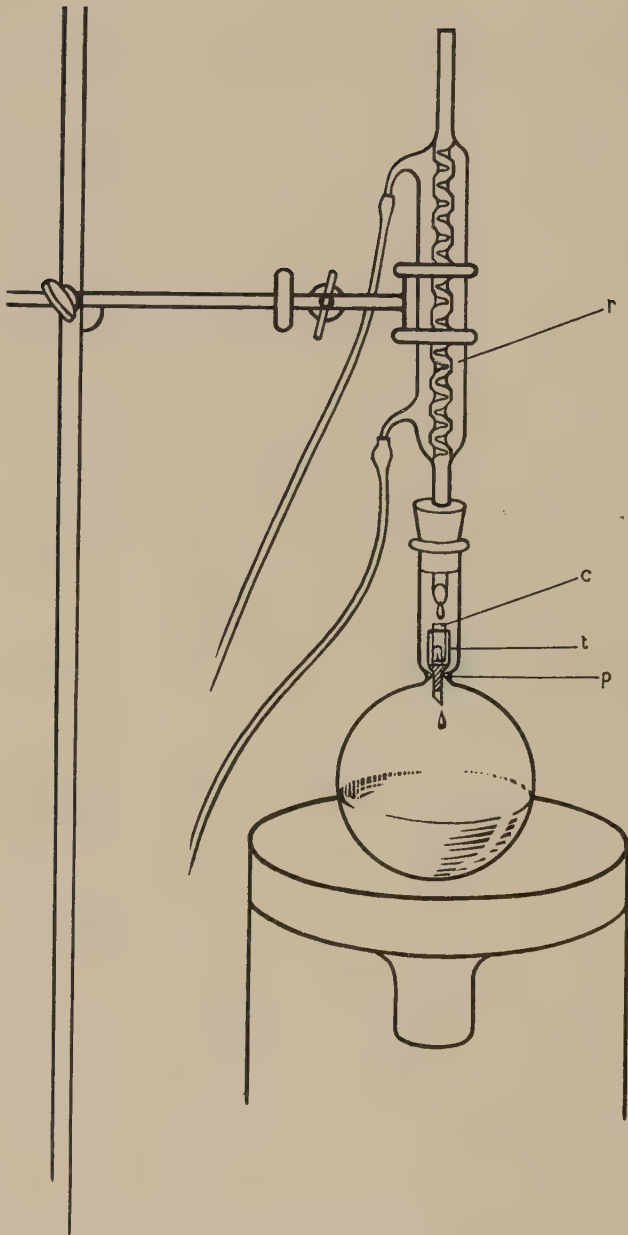


FIG. 5. — Dispositif d'épuisement de petites quantités de matière végétale en vue du dosage de la tyrosine et de l'azote protidique

TABLEAU XVIII

Échantillon.	Analyse.				Moyenne.
	n° 1	n° 2	n° 3	n° 4	
	mg	mg	mg	mg	mg
N° 7 dégraissé.	8,75	9,12	8,62	9,50	9
N° 7 non dégraissé.	15,12	14,37	13,87		14,45

Cette discordance pouvait faire craindre des pertes de tyrosine au cours de ces épuisements. Il n'en est rien comme le montrent les observations et les expériences suivantes :

1° La *tyrosine libre*, si toutefois il s'en trouve dans les germes, est pratiquement insoluble dans l'alcool.

Nous vérifions cependant ce point par la méthode des quantités ajoutées. Sur l'échantillon n° 3 sont effectués deux dosages-témoins et, à deux autres prises d'essais du même échantillon, sont ajoutés 5 mg de tyrosine avant les épuisements :

TABLEAU XIX

N° 3.	N° 3 + 5 mg tyrosine.	Tyrosine retrouvée.	Erreur relative.
mg	mg	mg	
9,40	14,65	5,25	5 % par excès
9,45	14,32	4,87	4,6 % par défaut

Une autre vérification, sur un échantillon de malt M₁, donne les résultats suivants :

TABLEAU XX

M ₁	M ₁ + 5 mg tyrosine.	Tyrosine retrouvée.	Erreur relative.
mg	mg	mg	
5,06	10,01	4,95	1 % par défaut

Ces valeurs prouvent que, s'il y a de la tyrosine libre dans nos échantillons, elle est dosée au même titre que celle faisant partie des matières protidiques, laquelle n'est libérée qu'après hydrolyse.

2° Les *matières protidiques* ne peuvent être entraînées au cours de ces lavages : les globulines, en particulier, ne sont

solubles que dans l'alcool à 70° et notre traitement s'effectue avec de l'alcool à 90-95°.

Les traitements doivent être *prolongés* car, nous l'avons vu à propos du dosage de l'hordénine, l'alcool fort n'est pas le meilleur solvant; c'est la raison qui, jointe aux nécessités de l'hydrolyse ultérieure, nous impose la pulvérisation.

Enfin, ces traitements de 4 et 3 heures sont *suffisants*.

Craignant tout d'abord qu'ils ne le soient pas, en raison d'irrégularités que nous avons reconnues être dues à une tout autre cause, nous effectuons des dosages comparatifs :

a) sur les produits traités par la méthode précédente; c'est ce que nous désignons dans le tableau XXI sous le nom de « dégraissage simple »;

b) sur les mêmes produits qui, après avoir subi le double traitement précédent, sont placés directement dans le ballon, au bain-marie, et, ainsi traités successivement par l'alcool et l'éther. Ceci revient à faire suivre la double extraction à froid d'une double extraction à chaud; nous désignons par « dégraissage mixte » cette technique plus compliquée.

TABLEAU XXI.

Échantillon.	Dégraissage simple tyrosine.	Dégraissage mixte tyrosine.
	mg	mg
Orge	5,75	5,93
M 4	4,73	4,88
M 6	5,63	5,55
M 7	6,00	6,00

La comparaison des valeurs obtenues prouve que le « dégraissage mixte » est inutile.

Ainsi, la poudre végétale traitée par l'alcool puis par l'éther est prête à être analysée comme une matière protidique.

IV. — HYDROLYSE

Nous adoptons le mode opératoire de O. FOLIN mais en utilisant le chauffage au bain de glycérol au lieu de celui à feu nu, ce qui évite des points de surchauffe. Nous employons la soude à 20 % pendant 20 heures.

V. — CONSERVATION DES HYDROLYSATS

O. FOLIN indique qu'il faut conserver les hydrolysats à la glacière et le moins longtemps possible avant de les soumettre à la suite de l'analyse. Nous avons recherché sans succès de divers côtés la cause de certaines irrégularités dans les dosages de tyrosine, dans les malts en particulier (1). Ces irrégularités se produisaient toujours au cours d'analyses faites aussitôt après l'hydrolyse, c'est-à-dire dans les conditions les plus favorables d'après O. FOLIN. Si l'on recommence les analyses sur les mêmes hydrolysats ayant séjourné 3 à 4 jours dans la glacière à $+ 5^{\circ}$, le dosage reprend une allure normale. Ajoutons que ce séjour peut être prolongé pendant assez longtemps sans inconvénient, comme le prouvent les analyses suivantes de tyrosine faites après 3 jours, 8 jours et 3 semaines :

TABLEAU XXII

Échantillon.	3 jours.	8 jours.	3 semaines.
	mg	mg	mg
N ^o 3	9,62	9,25	9,40

L'explication la plus logique de ce phénomène semble être une certaine prolongation à froid de l'hydrolyse; dans l'espoir de palier à cet inconvénient, nous prolongeons, dans les expériences suivantes, la durée de l'hydrolyse à chaud : 30 heures au lieu de 20 et comparons les résultats obtenus à partir d'un même échantillon de malt M3, analysé dans des conditions variées. Le test observé ici n'est pas le chiffre de tyrosine, mais les valeurs d'absorption des colorations initiales des liqueurs avant la réaction de MILLON — à la fois dans le bleu et dans le vert. Les valeurs 9-12 environ sont normales; par contre les valeurs 11-23 sont nettement trop fortes :

(1) Ces irrégularités se manifestaient par une coloration de base trop prononcée et surtout variable d'une analyse à l'autre, et ce, avant l'apparition de la coloration de la réaction de MILLON proprement dite.

TABLEAU XXIII

Echantillon	Expérience	Durée hydrolyse à chaud (en heures).	Séjour glacière (en jours)	Absorption de base	
				bleu. $\lambda = 450 \text{ m}\mu$	vert. $\lambda = 520 \text{ m}\mu$
M 3	<i>a</i>	20	néant	23,5	11,5
	<i>b</i>	30	néant	23	11,5
	<i>c</i>	20	8	12,5	9,5
	<i>c'</i>	20	15	12,5	9,5
	<i>b'</i>	30	8	12,5	9

Ainsi, la prolongation de l'hydrolyse à chaud ne remplace pas la nécessité d'un séjour à la glacière. Ceci peut encore s'expliquer par le fait que si l'hydrolyse à chaud s'effectue en milieu alcalin, l'évolution à la glacière se fait en milieu acide.

Nous sommes donc conduit à limiter à 20 heures l'hydrolyse par la soude au 1/5 et à laisser l'hydrolysate au moins 3 jours à la glacière à $+ 5^{\circ}$ avant d'effectuer la suite de l'analyse.

Notons au passage que nous avons eu là à résoudre une difficulté typique de l'analyse immédiate en milieu complexe. Nous disposons d'une réaction spécifique et mesurable de la substance à doser, mais cette réaction est influencée par des corps inconnus, dans une proportion qui ôterait toute précision à l'analyse si l'on n'y remédiait. Le remède, on le voit, est empirique et ne peut être trouvé qu'après avoir fait varier isolément un grand nombre de facteurs.

VI. — ÉLIMINATION DU TRYPTOPHANE

Nous utilisons la technique de O. FOLIN. Toutefois 5 minutes de centrifugation sont souvent insuffisantes pour obtenir une sédimentation complète du complexe mercure-tryptophane. Nous portons ce temps à 10 minutes,

VII. — DOSAGE COLORIMÉTRIQUE

C'est sur ce point que la modification la plus importante à la technique de O. FOLIN est apportée. Cet auteur préconise la lecture au colorimètre aussitôt que le nitrite de sodium est ajouté sinon, dit-il, il apparaît un louche gênant cette lecture.

L'imprécision de celle-ci est peut-être négligeable dans les dosages de tyrosine à partir de matières protidiques, mais ne l'est certainement pas dans le cas de nos hydrolysats de plante entière. Ici, le louche est immédiat et apparaît en même temps que l'on opère la dilution à 100 cm³ dans la fiole jaugée. De plus, le liquide présente toujours, avant l'addition du nitrite de sodium, une coloration jaune clair qui peut gêner la comparaison ultérieure avec le témoin (c'est précisément pour diminuer l'intensité de cette couleur que nous conseillons un séjour à la glacière).

Nous avons à la fois évité de faire un témoin pour chaque dosage (1) et beaucoup augmenté la sensibilité de la lecture en remplaçant le colorimètre de DUBOSQ généralement utilisé par un électrophotomètre à coin et cellules à couches d'arrêt dû à P. MEUNIER (97).

Cet appareil permet des mesures comparatives colorimétriques ou opacimétriques par évaluation de l'intensité lumineuse absorbée. Nous utilisons l'absorption dans le vert et le bleu qui fournissent les meilleures lectures avec la coloration rose due à la réaction de MILLON. L'avantage de cette mesure dans deux couleurs est, en réalisant une analyse partielle du spectre, de vérifier par la *nature* de la couleur la spécificité de la réaction colorée envisagée. Il y a là une vérification qualitative qui compense le plus grave défaut de la colorimétrie.

Il y a dans notre cas deux difficultés : 1^o le louche qui apparaît lors de la dilution et 2^o la coloration de base, sur lesquels vient se superposer la réaction de MILLON à mesurer.

(1) Les témoins ne peuvent se conserver, la coloration due à la réaction de MILLON disparaissant progressivement après une heure.

Le louche étant dû à une hydrolyse partielle du sulfate mercurique SO^4Hg , passant à l'état de sulfate basique $\text{SO}^4\text{Hg}, 2\text{HgO}$, jaune et insoluble, nous avons pensé empêcher sa formation en complétant le volume à 100 cm^3 avec SO^4H^2 2 N au lieu d'eau distillée. Malheureusement, si dans ce cas toute précipitation est évitée, l'augmentation considérable de l'acidité du milieu diminue beaucoup l'intensité de la réaction et même sa nature :

TABLEAU XXIV

	Acidité normale.		Acidité augmentée.	
	vert.	bleu.	vert.	bleu.
Absorption.....	37,5	48	18	34
Valeur de tyrosine en mg	0,50	0,50	0,18	0,36
Absorption.....	83	101	68	88
Valeur de tyrosine en mg	1,50	1,50	0,88	1,22

Le tableau précédent fait ressortir que l'intensité de la coloration due à $0,50\text{ mg}$ de tyrosine dans 100 cm^3 tombe, lorsque l'acidité est augmentée, de 37,5 à 18 dans le vert et de 48 à 34 dans le bleu. De plus, les valeurs que représentent en tyrosine ces absorptions diminuées ne sont plus identiques dans les deux couleurs : 0,18 et 0,36. Les mêmes constatations peuvent se faire pour la coloration que donne $1,50\text{ mg}$ de tyrosine dans 100 cm^3 .

Au lieu d'acidifier, nous filtrons (1), *après* avoir complété le volume à 99 cm^3 avec de l'eau distillée. Au liquide limpide contenu dans une fiole jaugée de 100 cm^3 , on ajoute 1 cm^3 de la solution de NO^2Na à 2 %.

Avant d'utiliser cette réaction colorée, il nous a paru indispensable d'étudier son évolution en fonction du temps, à la fois dans le milieu connu des solutions étalons et dans celui complexe des hydrolysats. Il est bien évident que

(1) Il est recommandable, pour cette filtration, d'utiliser un papier très serré, type Berzélius 00 ou équivalent,

l'imprécision finale de la mesure réalisée sur une coloration évoluant rapidement, rend inutiles et même incontrôlables les modifications apportées aux autres parties de la technique de dosage. C'est pourquoi, la simple remarque de O. FOLIN conseillant de faire la lecture dès l'addition du nitrite, nous paraît un peu trop sommaire.

ÉVOLUTION DE LA RÉACTION DE MILLON.

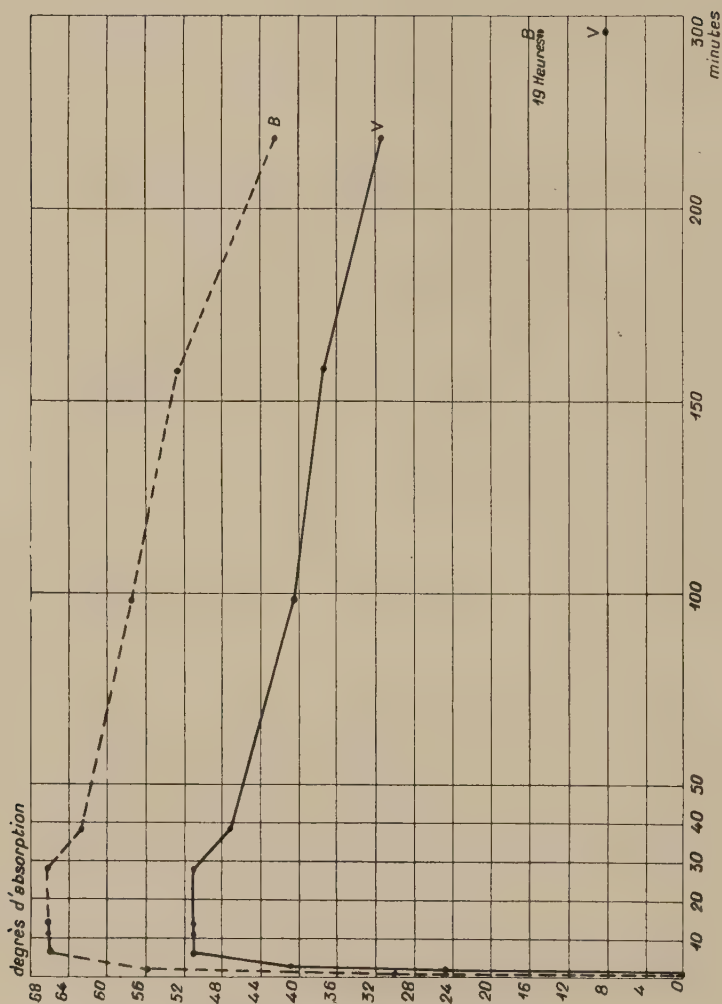
Dans les conditions indiquées par O. FOLIN et CIOCALTEU, c'est-à-dire en milieu sulfurique environ normal, l'addition à froid de nitrite de sodium en solution à 2 % (cette solution s'altère facilement et ne doit jamais avoir plus de 48 heures), produit, en présence de tyrosine et de sel de mercure comme catalyseur, l'apparition d'une coloration rose. A la température de 18 à 20°, à laquelle nous opérons, cette coloration *n'a pas immédiatement son intensité maxima*; cela peut, en première approximation, se constater à l'œil nu, sans aucun appareil.

Mais à l'aide de l'appareil à cellule, nous pouvons suivre exactement la variation des absorptions en fonction du temps. C'est ce qu'indique le tableau XXV où les mesures sont établies pour une solution-étalon renfermant 0,7 mg de tyrosine dans 100 cm³.

TABLEAU XXV.

Temps...	0	1'	2'30"	6'	11'	14'	28'	38'	1 ^h 38'	2 ^h 38'	3 ^h 38'	19 ^b
Absorp- { Bleu.	2	30	56	66	66	66	66	63	57,5	52,5	42,5	15
tions { Vert.	0	25	41	51	51	51	51	47,5	40,5	37,5	31,5	8

Le graphique II montre cette évolution en fonction du temps : les deux courbes d'absorption dans le vert et dans le bleu atteignent après 6 minutes un maximum qui se maintient pendant 22 minutes (temps 28'). Les deux courbes s'abaissent ensuite lentement. On remarque que le plateau s'établit et se termine exactement en même temps pour les deux couleurs,



Graphique II.

Variation des absorptions en lumières verte et bleue de la réaction de MILLON en fonction du temps.

Si, reprenant le tableau précédent, on indique à chaque instant, la quantité de tyrosine que représente chaque absorption, on remarque que les valeurs ne sont identiques dans les deux couleurs que pour le plateau : avant 6' et après 28', elles sont différentes. Ceci prouve que non seulement l'intensité, mais la couleur de la réaction changent en fonction du temps. Le tableau XXVI et le graphique III rendent compte de ces variations :

TABLEAU XXVI

Temps	0	1'	2'30"	6'	11'	14'	28'	38'	1 h. 38'	2 h. 38'	3 h. 38'	19 h.
Valeurs en tyrosine { Bleu.	0	0,32	0,58	0,70	0,70	0,70	0,70	0,68	0,61	0,57	0,43	0,14
Vert.	0	0,34	0,56	0,70	0,70	0,70	0,70	0,64	0,56	0,50	0,40	0,11

Il ressort de cette étude que la lecture de la coloration fournie par la réaction de MILLON, dans les conditions où nous opérons, doit se faire entre 10 et 28 minutes après addition du nitrite de sodium.

En milieu complexe, à partir d'un hydrolysats, l'évolution présente exactement la même allure comme le prouve le tableau XXVII, établi avec l'échantillon n° 3.

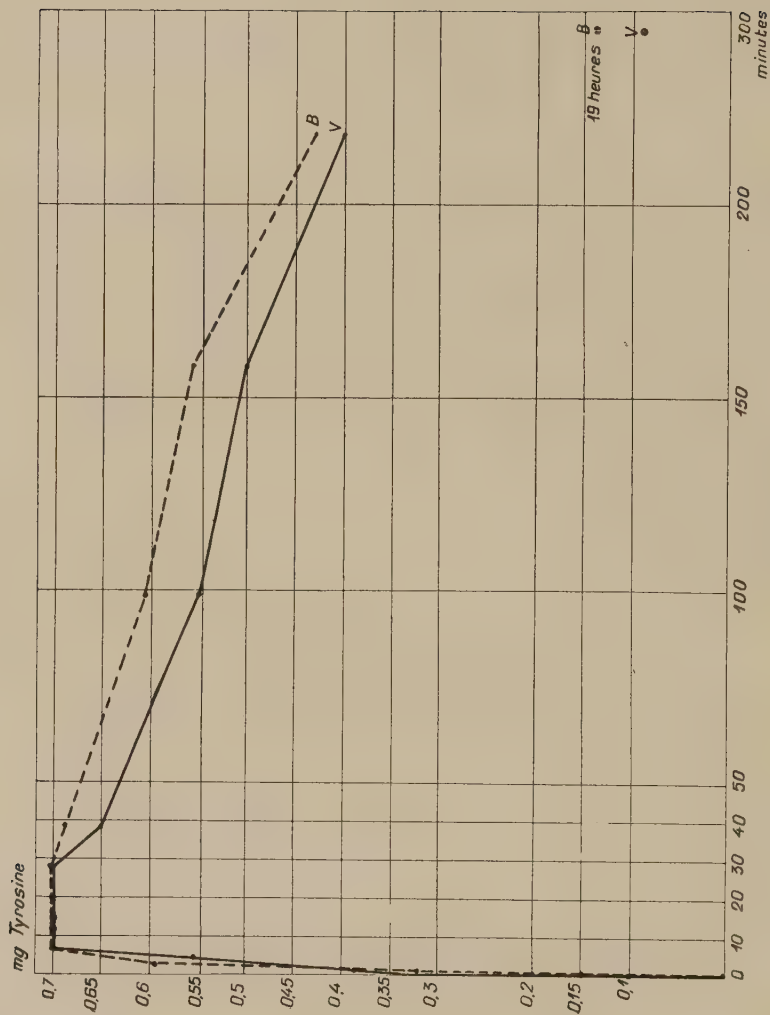
TABLEAU XXVII

Temps	5'	10'	15'	20'	60'	120'
Absorptions { Bleu	67	70	70	70	70	64
Vert	56	57,5	57,5	57,5	57,5	52

Dans cet exemple, le plateau se maintient encore une heure après le début de la réaction.

ÉTABLISSEMENT DES COURBES D'ABSORPTION DES SOLUTIONS-ÉTALONS.

Ces courbes correspondent aux valeurs d'absorption des solutions-étalons en fonction de la concentration de tyrosine. Nous établissons ces courbes pour des concen-



Graphique III.

Variation des valeurs de tyrosine de la réaction de MILLON en fonction du temps.

trations de tyrosine allant de 0 à 2,5 mg dans 100 cm³, de 1/10 en 1/10 de mg.

Nous mesurons, dans chaque cas, l'absorption dans le vert et le bleu (longueurs d'ondes : λ vert = 520 m μ ; λ bleu = 450 m μ).

Les étalons sont préparés comme dans la technique de O. FOLIN, sauf en ce qui concerne la teneur en tyrosine, ici beaucoup plus basse (utilisant moins de 5 cm³ de la solution mère dans SO⁴H² 2 N, avoir soin de compléter la différence de la quantité prélevée à 5 cm³ avec SO⁴H² 2 N).

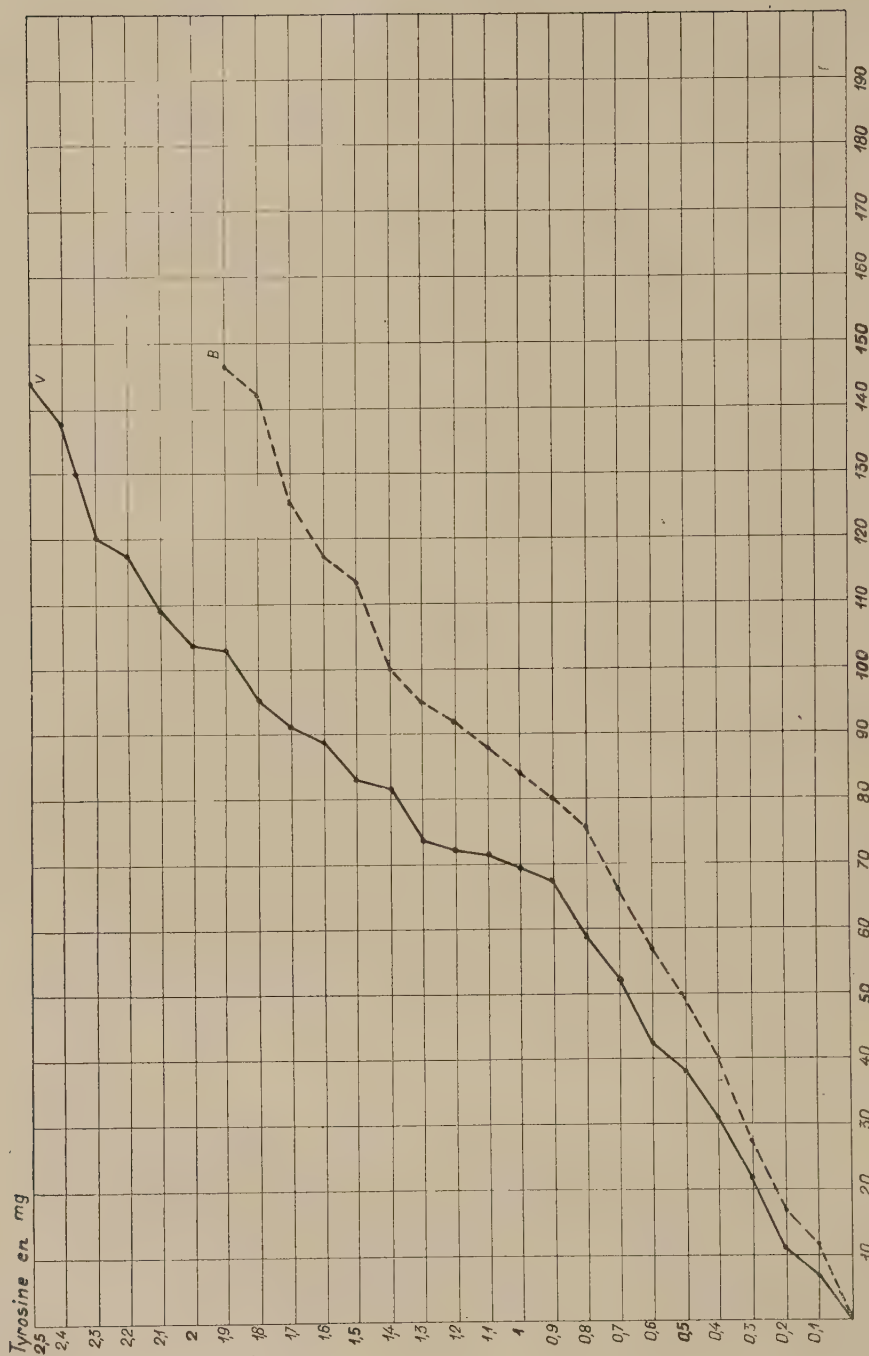
Il est nécessaire de resserrer beaucoup les points expérimentaux de ces courbes pour diminuer les causes d'erreur par extrapolation en raison des irrégularités du coin photographique (1). Cette remarque fait comprendre l'allure quelconque des courbes obtenues qui sont figurées sur le graphique IV.

La dernière difficulté à résoudre est due à l'existence de la légère coloration jaune du liquide, après dilution à 99 cm³ et filtration, avant l'addition de NO² Na.

Si cette coloration initiale donnait à chaque dosage une valeur constante d'absorption dans les deux couleurs, on pourrait établir les courbes-étalons en ajoutant cette absorption à chaque valeur trouvée. Bien qu'entre des limites assez rapprochées, ces absorptions varient d'une expérience à l'autre. Pour cette raison, avant l'addition de nitrite, nous mesurons les absorptions de la coloration de base dans les deux couleurs et nous retranchons les valeurs de tyrosine que représentent ces absorptions des valeurs correspondantes *également en tyrosine*, obtenues après addition du nitrite de sodium (2).

(1) Dans l'appareil définitif de P. MEUNIER, le coin photographique est remplacé par un coin photométrique en verre taillé.

(2) On ne peut retrancher directement les valeurs d'absorption en raison de la non-proportionalité du coin. La soustraction des valeurs *de tyrosine* n'est elle-même possible qu'en raison de la très faible intensité de la coloration initiale.



Graphique IV.

Courbes d'étalonnage en tyrosine de la réaction de MILLON en fonction des absorptions en lumières bleue et verte.

Exemple :

Absorption de la coloration de base :

Bleu : 8,5 représentant 0,07 mg de tyrosine.

Vert : 6 — 0,09 mg —

Absorption après réaction de MILLON :

Bleu : 72,5 représentant 0,84 mg de tyrosine.

Vert : 66,5 — 0,89 mg de —

Les concentrations de tyrosine de notre solution seront :

1° D'après les absorptions dans le bleu :

$0,84 - 0,07 = 0,77$ mg, dans 100 cm³.

2° D'après les absorptions dans le vert :

$0,89 - 0,09 = 0,80$ mg, dans 100 cm³.

VIII. — DEGRÉ DE PRÉCISION
DE NOTRE MÉTHODE

La méthode des quantités ajoutées que nous avons étudiée (voir p. 99) nous permet d'assurer que les chiffres fournis sont exacts à ± 5 % près. Cette précision est très supérieure à celle (d'ailleurs difficilement prévisible) des méthodes jusqu'ici utilisées et dont on trouve une revue dans la thèse de M. J. GUÉRIN (54).

CHAPITRE III

DOSAGE DE L'AZOTE PROTIDIQUE

Bien que nous recherchions plus particulièrement s'il existe des relations entre l'évolution des teneurs en hordénine et tyrosine des radicules d'Orge au cours de la germination, il n'était pas sans intérêt de voir ce que devenait l'azote des matières protidiques dans les mêmes conditions. De tels dosages ont été fréquemment effectués au cours des recherches sur l'origine ou le rôle des alcaloïdes.

Nous reviendrons, dans les considérations générales qui terminent l'exposé de ce travail, sur le bien-fondé de telles déterminations. Les chiffres d'azote des matières protidiques totales et ceux de l'azote des alcaloïdes sont tels que, bien souvent, les erreurs sur les premiers sont plus grandes que les valeurs absolues des seconds. Ce n'est donc pas dans le but de faire de telles comparaisons que nous dosons l'azote protidique et nous préciserons ce point dans l'application que nous faisons de ce dosage.

Pour nous en tenir ici à une question de technique, disons tout de suite que nous n'avons pas la prétention de doser un azote sûrement et strictement protidique. Dans l'ancienne méthode de A. STUTZER (128), les matières protidiques sont précipitées par l'hydrate de protoxyde de cuivre et l'azote déterminé par la méthode de WILL et VARRENTRAPP appliquée au précipité.

CLAUTRIAU (31), dans ses recherches sur l'azote dans les capsules de Pavot, s'est contenté de doser cet élément par la méthode de WILL et VARRENTRAPP sur des résidus d'épuisements par l'alcool tartrique, chargé de s'emparer des alcaloïdes.

Les échantillons nous servant dans les dosages de tyrosine étant privés d'hordénine et de lipides après le double

épuisement par l'alcool et l'éther, se prêtent bien au dosage de l'azote protidique (ou tout au moins « protidique » pour une très grande part).

La poudre végétale, après épuisement, est détruite par la méthode de KJELDAHL (1) et l'ammoniaque dosée acidimétriquement en présence d'alizarine comme indicateur.

(1) Nous n'avons pas cru devoir utiliser la méthode de DUMAS pour ces dosages, la semi-microméthode généralement employée nous conduisant à prendre des prises d'essai trop faibles pour obtenir un dégagement gazeux ne dépassant pas le volume de l'azotomètre.

CHAPITRE IV

TECHNIQUE MICROCHIMIQUE

La technique que nous utilisons pour localiser l'hordénine rappelle de très près les techniques classiques. Aussi serons-nous très bref sur l'exposé de celles-ci, leur étude détaillée se trouvant dans l'excellente monographie de M. A. GORIS (53).

Les premières tentatives de localisations microchimiques de principes actifs remontent au russe BORSCOW (18) et à Joannès CHATIN qui fait paraître en 1876 une thèse sur le siège des principes actifs des plantes médicinales. C'est surtout ERRERA qui seul, ou en collaboration avec CLAU-TRIAU et MAISTRIAU (39), développe ce genre de recherches. Depuis cette époque, on peut dire que presque tous les principes actifs des plantes ont fait l'objet de recherches de localisation. Récemment, J. CHAZE (26) étudie, par exemple, la répartition des alcaloïdes dans le Tabac et en ce qui concerne l'hordénine des racines d'Orge, signalons une note de R. REILHES (113).

D'une façon générale, on utilise un réactif précipitant ou colorant du principe actif à localiser, réactif que l'on fait agir sur des coupes, ou lorsque les coupes ne sont pas possibles, sur des écrasements de l'organe envisagé. En ce qui concerne les alcaloïdes, il se trouve, circonstance heureuse qui a beaucoup facilité leur recherche, qu'un grand nombre de réactifs dits « généraux » les précipitent en raison de l'existence dans leur molécule d'un atome d'azote tertiaire. Le plus utilisé de ces réactifs est celui de BOUCHARDAT ou WAGNER-KIPPENBERGER pour la préparation duquel on utilise souvent la formule suivante :

Iode.....	1 g.
I K.....	3 g.
H ² O.....	100 g.

ou cette autre, conseillée par ERRERA pour préparer un réactif plus dilué :

Iode.....	0,10 g.
I K.....	0,30 g.
H ² O.....	45 g.

Ce réactif, comme tous les réactifs généraux d'alcaloïdes, précipite ceux-ci lorsqu'ils sont en solution aqueuse sous forme de sels. La réaction s'effectue dans un milieu légèrement acidifié par ClH ou CH^3COOH .

Parmi les autres réactifs souvent utilisés, citons celui de MAYER ou de VALSER (iodure de mercure et de potassium), dont ont été données d'innombrables variantes sur lesquelles nous reviendrons plus loin, ainsi que le réactif de DRAGENDOFF (iodure double de bismuth et de potassium).

La plupart de ces réactifs généraux et notamment tous ceux renfermant de l'iodure de potassium ont la propriété de redissoudre les précipités formés lorsque IK est en excès; pour cette raison, on a modifié leurs formules en essayant de les saturer en sel du métal lourd.

Les réactifs colorés sont soit des acides concentrés, soit des oxydants ou encore des réducteurs, donnant avec un grand nombre d'alcaloïdes des colorations plus ou moins caractéristiques.

Les réactifs précipitants ayant l'inconvénient de précipiter non seulement les alcaloïdes, mais encore les matières protidiques, ERRERA a préconisé une méthode de différenciation. Cette méthode consiste à opérer comparativement la précipitation ou la coloration :

1^o sur l'organe tel quel;

2^o sur l'organe préalablement épuisé par immersion pendant un temps variable dans l'alcool absolu ou dans l'alcool tartrique (solution d'acide tartrique au 1/20^e dans l'alcool absolu) ou dans l'alcool chlorhydrique (alcool absolu : 95 cm³, eau distillée : 5 cm³, ClH , dens. = 1,12 : 2 cm³).

Cette technique, sans la moindre modification, a été suivie par tous les auteurs ayant cherché à localiser les alcaloïdes.

Dernièrement J. CHAZE (26), à propos de la nicotine, a tenté d'introduire des méthodes de coloration vitale dont

l'origine remonte à PFEFFER (1886) mais dont le développement a fait l'objet de travaux importants de A. GUILLIERMOND depuis 1913. Le but que se propose J. CHAZE est alors de localiser le principe actif non pas seulement dans un tissu ou une cellule, mais à l'intérieur de celle-ci, dans tel ou tel territoire. Les réactifs vitaux sont les bleus de crésyl, de toluidine, de méthylène ou de Nil et surtout le rouge neutre dont la solution à 0,05 % n'est pas toxique (il colore le vacuome sans toucher au cytoplasma). La technique préconisée par J. CHAZE consiste à monter la coupe ou l'écrasement dans le rouge neutre; après examen, on se débarrasse de l'excès de colorant au moyen d'un papier filtre qui l'absorbe le long de la lamelle tandis que l'on fait arriver sous celle-ci une goutte de réactif précipitant (ici de BOUCHARDAT). De cette façon, l'auteur a pu caractériser la nicotine dans de très jeunes vacuoles, tout au début de leur existence, au moment de l'imbibition des grains d'aleurone.

Voici, dans le cas de l'hordénine à quelle technique nous sommes arrêté :

CHOIX D'UN RÉACTIF PRÉCIPITANT

On sait que l'un des plus sensibles de ces réactifs est l'acide silicotungstique ou réactif de G. BERTRAND qui donne avec l'hordénine un précipité blanc crème ne tardant pas à se transformer en aiguilles jaune chamois. Nous avons essayé de l'employer, mais quelle que soit la dilution utilisée, les résultats ne furent pas encourageants; la destruction de l'organisation cellulaire est très intense.

Le réactif de BOUCHARDAT a souvent paru l'un des plus pratiques en raison de la coloration brun kermès très visible des précipités. Dans le cas de l'hordénine contenue dans les radicules d'Orge ou d'autres plantes, où seuls les écrasements sont possibles, on obtient des précipitations confuses, peu lisibles, impossibles à reproduire par photographie.

Le réactif de MAYER (iodure de mercure et de potassium), nous a par contre donné les meilleurs résultats, contrairement aux réactifs de DRAGENDORFF, à l'acide picrique, au sublimé ou à l'acide phosphotungstique, également essayés.

Il n'y a aucun intérêt à adopter la modification de VALSER : saturation en iodure mercurique ou celle de TANRET : milieu acétique, le précipité fourni avec l'hordénine étant, dans *tous les cas*, soluble dans un excès de réactif. On a reproché au réactif de MAYER de donner des précipités blancs, peu visibles; dans le cas envisagé, le caractère primitivement amorphe du précipité donne à ce dernier une opacité qui le rend suffisamment net par transparence. Dans les cas positifs, nous avons reproduit les figures par microphotographie; nous nous interdisons sur ce point toute reproduction par dessin, ce procédé ayant donné lieu à des interprétations peu objectives, dans le domaine envisagé. Nous avons considéré ce point comme essentiel dans une méthode exclusivement visuelle où les préparations ne peuvent se conserver.

MÉTHODE DE DIFFÉRENCIATION

Nous avons essayé en premier lieu la technique d'ERRERA en utilisant le réactif de BOUCHARDAT, puis celui de MAYER qui convient mieux ici.

Dans un très grand nombre d'essais, où nous avons en particulier prolongé l'épuisement afin de dissoudre plus parfaitement l'alcaloïde, soit avec l'alcool absolu, soit avec l'alcool tartrique, ou encore avec l'alcool chlorhydrique, nous n'avons pas obtenu de résultat bien net. La précipitation apparaît dans les organes préalablement épuisés comme dans les autres. Si l'on excepte les cellules de coiffe, la seule région où s'observe un précipité est celle du méristème où se produit l'allongement radiculaire; d'autre part nous avons dosé l'hordénine dans des stades analogues. Comment expliquer la présence du précipité après traitement extractif? Si l'on admet que l'alcaloïde est accompagné de matières protidiques, la méthode de différenciation d'ERRERA devient inutilisable. Comme il n'est pas connu actuellement d'autre technique, il nous a semblé intéressant d'aborder le problème d'une autre façon.

Nous examinons *in vitro* la solubilité de l'hordénine ou de ses sels vis-à-vis des réactifs qu'ERRERA préconise pour

dissoudre l'alcaloïde quel qu'il soit. Si l'hordénine-base est assez soluble dans l'alcool absolu, le sulfate est très peu soluble; dans l'alcool tartrique, l'hordénine est faiblement soluble et le sulfate, insoluble. La base est soluble dans l'alcool chlorhydrique où le sulfate n'entre que lentement en solution.

Ces résultats étaient d'ailleurs faciles à prévoir. Les sels d'alcaloïdes sont en général solubles dans l'eau, moins solubles dans l'alcool et, d'autant moins, que le titre de celui-ci est plus élevé; ils sont presque insolubles dans l'alcool absolu. Nous avons ainsi observé qu'avec la nicotine, l'alcool tartrique donne tout d'abord *un précipité*, qui se redissout, mais très lentement; le tartrate de quinine, par exemple, est rigoureusement insoluble dans l'alcool absolu.

On peut faire remarquer que l'alcool absolu du réactif est dilué par l'eau des tissus et que la solubilité des sels d'alcaloïdes se trouve augmentée. Nous objecterons à ceci qu'en raison du grand excès de réactif utilisé (on fait baigner la coupe de l'organe dans un verre de montre contenant le réactif), l'abaissement du titre ne doit pas être bien important. Autre argument pouvant être avancé : la quantité d'alcaloïde renfermé dans la coupe ou dans le fragment d'organe examiné est très petite d'une part et l'insolubilité absolue n'existant pas d'autre part, les questions de solubilité ne doivent guère intervenir. Nous pensons que la réponse à opposer doit distinguer deux cas :

1^o On place *les coupes* déjà faites dans l'un des réactifs d'Errera ; dans ce cas, les tissus sont largement déchirés, le solvant pénètre facilement et l'alcaloïde a beaucoup de chance d'être dissous. Il sera toujours bon de s'assurer néanmoins des conditions de solubilité *in vitro*.

2^o On place *un organe* dans le réactif et c'est ce que nous sommes obligé de faire dans le cas des germes que nous étudions. Ici, l'alcool absolu pénètre mal et nous l'avons bien vu en étudiant la technique de dosage de l'hordénine. L'alcool fort n'est pas le meilleur solvant et pour cette raison, nous avons adopté l'eau faiblement acidifiée.

Pour la pratique microchimique, nous avons essayé l'alcool à 85° et même l'eau franchement acidifiée par 5 %

de SO^4H^2 . Les matières protidiques sont insolubles et les alcaloïdes libres ou salifiés plus aisément solubles dans ce solvant que dans l'alcool absolu.

Nous représentons *planche I, en A* : un écrasement de radicelle de Millet traité par le réactif de MAYER. On remarque à quelque distance de la coiffe de longues files de cellules à contenu foncé renfermant l'hordénine précipitée par le réactif.

Planche I, en B : une radicelle de Millet traitée 12 heures par SO^4H^2 à 5 %, écrasée ultérieurement dans le réactif de MAYER. On voit, au bas de la photographie, par la convergence des files de cellules, l'emplacement approximatif de l'extrémité de la racine. Les files de cellules du milieu de la photographie devraient donc être bourrées de précipité comme en A; seules quelques-unes d'entre elles contiennent une précipitation très légère.

AUTRE TECHNIQUE

Malgré les modifications que nous apportons à la méthode d'ERRERA, la différenciation ne pouvant s'effectuer sur une même préparation, n'a que peu de valeur.

Nous avons vu que les précipités fournis par les alcaloïdes étaient solubles dans un excès de réactif. Cette propriété est-elle spécifique? On trouve dans la littérature que les précipités que donnent les matières protidiques avec les mêmes réactifs sont également redissous dans un excès.

Nous avons vérifié ce point avec des matières protidiques végétales telles que la légumine et l'édestine et avons constaté qu'avec le réactif de MAYER, la redissolution était bien plus difficile à obtenir que dans le cas des alcaloïdes et de l'hordénine en particulier. Nous avons préparé alors un réactif de MAYER *plus dilué* et constaté que, cette fois, les précipités donnés avec la légumine et l'édestine ne se redissolvaient plus, même en utilisant un très grand excès de réactif. Au contraire, le précipité donné par l'hordénine reste si facilement soluble qu'il faut prendre la précaution de verser la solution d'hordénine dans une goutte de réactif au lieu de faire l'inverse, pour être certain de voir le précipité,

d'ailleurs très abondant, qui prend naissance. Nous avons préparé une petite quantité d'hordéine, matière protidique de l'Orge, par la technique d'OSBORNE (102) et avons vérifié la non-redissolution du précipité obtenu dans notre réactif dilué.

Formule du réactif :

HgI ²	0,25 g.
I K.....	5 g.
H ² O.....	50 g.

Voici dès lors comment nous opérons : une radicelle d'Orge est écrasée entre lame et lamelle et l'on verse sur la préparation une goutte de réactif de MAYER dilué. Après une ou deux minutes, on prend une première photographie : planche II, A.

Notons à ce sujet qu'ainsi que l'a remarqué R. REIHLES (113) l'hordénine est localisée dans les cellules de la partie de la radicelle où se produit l'allongement. Dans la région où les cellules ont une forme plus allongée et où commencent à se différencier quelques vaisseaux, on ne trouve plus d'alcaloïde.

Enfin, la localisation apparaît homogène dans le tissu méristématique.

Après 2 heures (planche II, B), on note un effacement partiel.

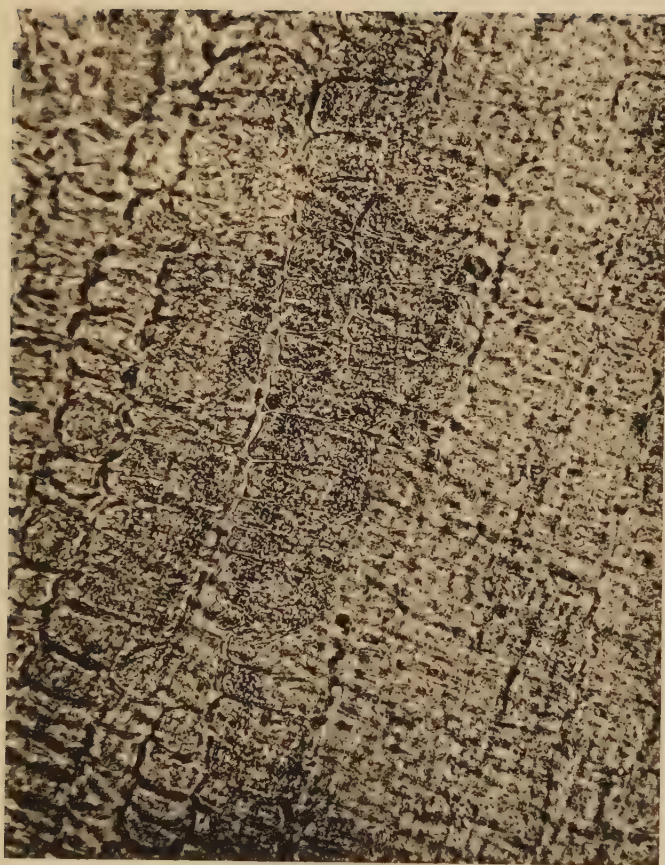
Après 4 heures (planche II, C), effacement total par redissolution.

(On reconnaît facilement sur les trois photographies qu'il s'agit de la même préparation, ce qui permet de faire la comparaison).

On remarquera par ailleurs sur la planche III, l'aspect du précipité, très grossi.

La technique précédente est probablement généralisable à d'autres alcaloïdes que l'hordénine, mais on devra toujours faire une petite étude préliminaire dans chaque cas.

Dans l'application de la méthode d'ERRERA, une telle étude a visiblement manqué dans de trop nombreuses recherches de localisations.



Radicelle Orge.
Précipité alcaloïdique $\times 800$.

TROISIÈME PARTIE

CHAPITRE PREMIER

RÉPARTITION DE L'HORDÉNINE DANS LES VÉGÉTAUX

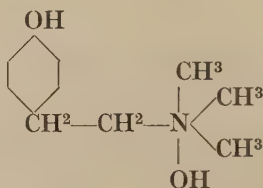
I. — CHOIX DES FAMILLES ÉTUDIÉES

Il n'est pas indifférent, avant de tenter une explication touchant le rôle et l'origine de l'hordénine, de se rendre compte de sa répartition éventuelle entre les diverses espèces végétales. Sa rareté, ou au contraire une vaste diffusion, peuvent orienter les recherches.

A première vue, cet alcaloïde paraît exceptionnellement localisé dans une plante, l'Orge, de la famille des Graminées, où la présence d'alcaloïde est non moins exceptionnelle. Mais nous savons qu'en réalité, l'hordénine a été isolée pour la première fois, non des touraillons d'Orge, mais du suc d'une Cactée mexicaine, l'*Anhalonium fissuratum* Engelm ou *Ariocarpus fissuratus* Scheidw. par LEWIN (91) puis HEFFTER (64). Le rendement avait d'ailleurs été très bas : 0,20 g par kilogramme de Cactus. A partir d'autres espèces d'*Anhalonium*, l'*A. Lewinii* Hennings ou *Echinocactus Lewinii* Schumann et l'*A. Williamsii* Salm-Dyck, lesquels constituent les « Mescal Buttons », ont été retirés, non plus l'anhaline ou hordénine, mais six autres alcaloïdes de formules parentes et que nous avons indiquées pages 20 et 21. On doit à HEFFTER (65) et surtout à SPAETH et ses élèves (123, 124, 125, 126) leur étude approfondie.

Nous avons vu dans l'étude des propriétés pharmacologiques de l'hordénine que récemment, en 1933, L. RETI

(112) a isolé cet alcaloïde de la Cactée *Trichocereus candicans* Br. et Rose. (M. A. NIEDFELD (99) avait, en 1931, prouvé microchimiquement l'existence d'alcaloïde dans cette plante). A côté de l'hordénine se trouve aussi la base ammonium quaternaire :



Il est vraisemblable que des investigations systématiques des Cactées sud-américaines élargiraient le cercle encore réduit du domaine de l'hordénine. En raison du caractère exotique de ces plantes nous n'avons fait dans cette famille qu'une seule recherche portant sur une espèce qui, bien que d'origine également américaine, est maintenant naturalisée en Afrique du Nord et sur le pourtour de la Méditerranée : le Nopal ou Figuier de Barbarie (*Opuntia vulgaris* Mill. Gard. Dict.).

1^o FAMILLE DES CACTÉES (*Opuntia vulgaris* Mill. Gard. Dict.).

Nous avons opéré sur 655 g de matière fraîche constituée par les tiges aplaties en forme de raquettes, armées de dangereuses épines.

Les extractions sont effectuées en premier lieu avec l'alcool à 90° pour se débarrasser de la quantité considérable de sels minéraux, oxalates surtout, que cette plante renferme et dont le rôle, très important, consiste à diminuer la transpiration.

En poursuivant l'application de la méthode de STASS, nous n'avons pu isoler d'hordénine ni d'autre alcaloïde.

2^o FAMILLE DES GRAMINÉES

La famille des Graminées, bien plus accessible pour nous, où l'Orge renferme de l'hordénine dans ses radicules, a retenu toute notre attention. Il ne pouvait cependant être

question d'entreprendre l'étude systématique de la composition de toutes les plantes d'une famille aussi importante. Voyons donc quelles considérations ont pu orienter nos recherches.

Nous remarquons tout d'abord l'énorme distance séparant, au point de vue systématique, les Cactées, dicotylédones dialypétales, des Graminées, monocotylédones. Cette dispersion de l'hordénine fait penser au cas analogue des plantes à caféine. Or, au point de vue chimique, l'hordénine par sa parenté avec la tyrosine, et les alcaloïdes du groupe de la caféine par la leur avec les bases xanthiques des nucléoprotides, se rapprochent très facilement des matières protidiques universellement répandues. Cette remarque nous amène à penser qu'un alcaloïde comme l'hordénine devrait être répandu dans des plantes d'organisation très variée (1). Le même raisonnement fait comprendre que des alcaloïdes assez particuliers, comme ceux du groupe de l'atropine, ne se trouvent que dans des plantes très voisines d'une même famille. Un alcaloïde, extrêmement complexe comme la morphine, n'a aucune chance de se trouver hors du Pavot.

Nos investigations sont donc justifiables et deux auteurs ont été, avant nous, tentés de les entreprendre.

Le premier, TORQUATI (134), rechercha l'hordénine dans les radicelles de Blé, de Seigle et d'Avoine, avec un résultat négatif; la Vesce et le Lupin parmi les Légumineuses fournirent le même résultat. En raison de la méthode défectueuse utilisée par cet auteur, et que nous avons critiquée à propos du dosage de l'hordénine, nous ne pouvons considérer la question résolue pour les plantes citées plus haut.

Plus étendues sont les recherches de Yoshitaka HASHITANI (2) (145). En dehors de l'Orge, les radicelles de Millet

(1) Tout rapprochement entre Graminées et Cactées n'est pas impossible et le plus net serait, à notre point de vue, le mode de vie. Bien que de manière très différente, beaucoup de plantes de ces deux familles sont adaptées à la résistance à la sécheresse.

(2) Les travaux de cet auteur nous ont longtemps échappé en raison de leur publication dans une revue japonaise peu répandue. C'est après avoir terminé nos recherches dans ce domaine que nous en avons pris connaissance.

(*Panicum miliaceum* L.) fournissent à cet auteur 8,6 ‰ d'hordénine et celles de Sorgho (*Andropogon Sorghum* Brot.) 0,71 ‰. Dans ces deux cas seulement, des cristaux de l'alcaloïde peuvent être isolés. Les résultats avancés pour les autres plantes ne peuvent absolument pas être pris en considération en raison de la méthode, des plus critiquables utilisée par cet auteur. En effet, Yoshitaka HASHITANI se contente d'effectuer la réaction de MILLON sur les résidus d'évaporation d'extraction par l'éther en milieu alcalin. L'auteur fait remarquer que 2 ou 3/10 de mg donnent, dans 0,10 à 0,15 cm³, une coloration facile à constater; nous ajouterons personnellement que la réaction de MILLON est en réalité dix fois plus sensible. Le résidu d'extractions forcément nombreuses par l'éther ne pouvant être exempt de traces de matières protidiques qui, toutes, donnent cette réaction, la sensibilité — même est une raison de rejeter cette technique.

Quoi qu'il en soit, les résultats obtenus par Yoshitaka HASHITANI ont été les suivants :

Réaction de MILLON positive dans les cas de :

Avena Sativa L.,
Panicum frumentaceum Hook,
Zea Mays L.,
Panicum italicum L.,
Oryza sativa L.

Réaction de MILLON négative dans le cas de :

Triticum sativum L.

Hors des Graminées, réaction négative dans :

Fagopyrum esculentum (Buck wheat),
Soja hispida (Soy bean).

Il n'est fait par ailleurs aucune allusion à la famille des Cactées.

La famille des Graminées, une des plus nombreuses du règne végétal, comprenant environ 4.000 espèces réparties dans 350 genres pour l'ensemble du globe et 350 espèces en 80 genres pour la seule flore française, nous avons limité nos recherches :

1° Aux plantes très voisines de l'Orge cultivé;

2° A des plantes types de chaque tribu de la famille.

L'ensemble de la famille des Graminées se divise habituellement en treize sous-familles se groupant d'après ENGLER et PRANTL en 2 sections :

1^{re} Section : Epillets toujours uniflores : Andropogonées, Panicées, Maydéées, Zoysiées, Tristiginées, Oryzées.

2^e Section : Epillets généralement multiflores et parfois uniflores par avortement : Phalaridées, Agrostidées, Avenées, Chloridées, Festucées, Bambusées et Triticées.

Les plantes de la 1^{re} section appartiennent surtout aux régions chaudes du globe tandis que celles de la 2^e section appartiennent aux climats froids et tempérés.

II. — CHOIX DES PLANTES A ANALYSER (1)

1^o TRITICÉES. — Nous débutons par la sous-famille des Triticées puisqu'elle renferme l'Orge. Dans cette sous-famille, les Hordéacées constituent une tribu où l'on distingue deux types de très inégale importance :

a) les Orges : caryopse plan pourvu d'un sillon médian sur la face interne; une seule fleur par épillet.

b) les Elymes : caryopse largement canaliculé sur la face interne; 2 à 6 fleurs par épillet.

a) Les Orges (*Hordées*) comprennent un certain nombre d'espèces cultivées, d'après L. BLARINGHEM (15) :

Hordeum distichon Linné, très voisin de *H. spontaneum* C. Koch;

Hordeum compositum, lequel serait un *Elymus* (épillet de 2 à 6 fleurs);

Hordeum nudum Arduini, voisin de *H. spontaneum*;

Hordeum zeocriton L.;

Hordeum erectum, peut-être hybride entre *zeocriton* et *nutans*;

Hordeum nutans;

Hordeum hexastichum Stokes et vulgare L. (*tetrastichum*) ou Escourgeon.

L'examen des Orges cultivés peut avoir un certain intérêt, même du seul point de vue de la teneur en hordénine, une

(1) Nous marquons d'un astérisque (*) les plantes choisies. Les noms des sous-familles que nous indiquons par la suite sont empruntés au traité de BONNIER et sont très voisins de ceux adoptés par ENGLER et PRANTL.

telle connaissance pouvant éclairer par le côté chimique certains problèmes de classification. C'est là cependant un travail qui nous entraînerait trop loin de la question que nous examinons.

Nous n'étudierons ici que **l'Hordeum distichum erectum* (Orge Chevalier) et l'Orge de Colmar. L'étude de l'évolution de l'hordénine au cours de la germination de l'Orge Chevalier fait l'objet d'un chapitre particulier (III^e partie, chap. III).

b) les Orges *sauvages* comprennent :

**H. murinum* L.; nous avons récolté cette plante en grande quantité. Nous n'avons pu examiner les autres Orges sauvages, beaucoup plus rares. (Notre travail chimique exige des prises d'essais de germes de l'ordre de 10 g environ, ce qui représente une quantité de graines de départ importante. Certes, l'examen microchimique peut se faire sur une seule radicle, mais nous nous sommes fait une règle de faire parallèlement les examens chimique et microchimique.)

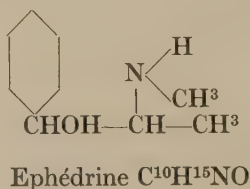
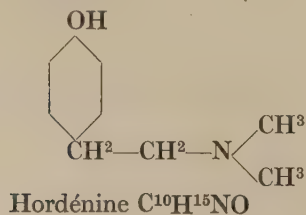
H. bulbosum Sieber, possède un petit bulbe au pied.

H. secalinum Savi, épis lâches, allongés et grêles, ressemblant au Seigle.

H. maritimum With Arr. Brit., lieux humides, sablonneux, côtes Méditerranée, Océan.

H. spontaneum C. Koch, épis désarticulables, grêles, très lâches, voisin de *H. distichum nutans*.

c) le genre **Elymus* : celui-ci nous intéresse tout d'abord en raison de sa proximité de l'Orge et aussi en raison de son habitat très spécial, les sables. On sait qu'au Japon, la Gnétacée *Ephedra* Tourn. qui renferme un alcaloïde, l'éphédrine isomère de l'hordénine, pousse également dans le sable; on pouvait donc se demander si l'habitat jouait un rôle dans la genèse de substances de ce type :



Nous avons récolté l'**Elymus arenarius* L. sur le rivage de la mer du Nord, près de Gravelines où cette plante, d'ailleurs rare, concourt avec l'Oyat à la fixation des dunes. Nous nous sommes également procuré des graines d'*Elymus* en Hollande.

Parmi les autres Triticées, nous avons examiné également :

c) **Triticum sativum* Lam., Blé (1),

d) **Secale cereale* L., Seigle,

e) **Lolium perenne* L., Ray grass.

2° FESTUCÉES. — Comprennent de très nombreuses espèces, nous choisissons les genres :

**Poa* (Paturin),

**Dactylis* (Dactyle).

3° CHLORIDÉES. — Nous n'avons pu nous procurer des graines de plantes de cette sous-famille.

4° ORYZÉES. — **Oriza* (Riz).

5° AVÉNÉES. — **Avena* (Avoine).

**Holcus* (Houque).

**Bromus* (Brome).

6° ARONDINÉES. — **Arundo* (Oyat).

7° STIPÉES. — Comme pour les Chloridées, nous n'avons pu nous procurer de graines.

8° AGROSTIDÉES. — **Agrostis*.

9° PHLEINÉES. — **Phleum* (Phléole).

**Alopecurus* (Vulpin).

10° PHALARIDÉES. — **Anthoxanthum* (Flouve).

11° MAYDÉES. — **Zea* (Maïs).

12° PANICÉES. — **Panicum* (Millet).

13° ANDROPOGONÉES. — **Sorghum* (Sorgho).

Le détail des recherches qui suivent comprend un double examen chimique et microchimique pour chaque plante étudiée.

(1) Les graines des plantes cultivées nous ont été fournies par la maison Vilmorin-Andrieux et C^{ie}.

III. — EXAMENS

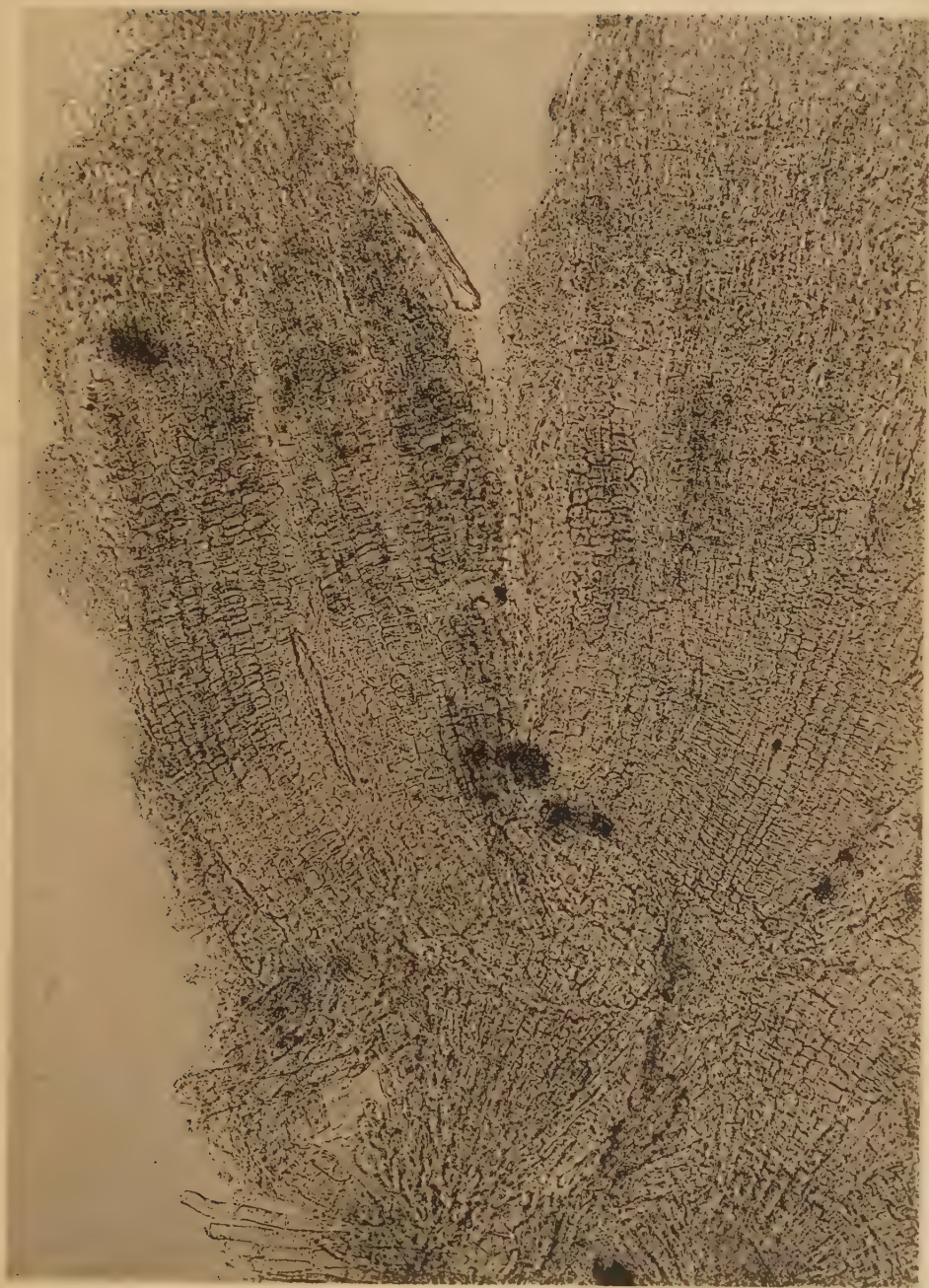
HORDEUM MURINUM L. (Orge des rats)

Nous avons récolté la plante dans la région parisienne où elle est très abondante; elle fructifie de juillet à septembre. Les graines sont entourées de très longues glumes et glumelles. Si les graines sont mises telles quelles à germer, il est ensuite impossible de séparer les radiculles. Il est donc indispensable de décortiquer les graines avant germination.

Nous faisons germer les graines (185 g) dans les mêmes conditions que celles de l'Orge, c'est-à-dire, en gros, dans les conditions de la malterie. La germination se fait à l'obscurité dans un lieu humide et frais (+ 16° C.) (1). On l'arrête lorsque l'aspect des germes correspond à un stade analogue à celui qui, dans l'Orge, se révèle le plus riche en hordénine. Il y a là évidemment un point délicat car cette façon d'opérer suppose un parallélisme de développement et de composition chimique qui restent à démontrer. Cependant, devant l'impossibilité de faire plusieurs analyses pour chaque plante, nous nous sommes appuyé sur l'examen microchimique pour arrêter la germination au moment le plus favorable.

Nous effectuons une première trempe des graines pendant 20 heures dans de l'eau de chaux; suit une aération de 6 heures puis une seconde trempe de 20 heures. *L'H. murinum* L. germe très facilement. Nous arrêtons après 5 jours par dessiccation à l'étuve à 65°. Les radiculles sont séparées en frottant les germinations sur un tamis. Les radiculles obtenues ont une grande ressemblance avec les touraillons d'Orge. Le produit ne renferme qu'un très petit nombre de jeunes feuilles.

(1) Il existe, en effet, au Laboratoire de Chimie biologique, à l'Institut Pasteur, un laboratoire situé à 18 mètres environ sous le niveau de la rue et formé d'un tronçon restauré des Catacombes. La température constante, l'atmosphère saturée de vapeur d'eau et l'obscurité absolue sont les caractéristiques de cette enceinte qui la rendent très précieuse pour de nombreuses recherches.



Radicelle *H. murinum*.
Précipité $\times 130$.

Poids des radicelles séchées : 15,75 g (rendement 85 ‰). L'Orge cultivé fournit dans le même temps un rendement de 55 ‰ environ.

Au point de vue microchimique. Prélèvement après 3 jours de germination : essai positif (voir planche IV). En raison de la petite quantité d'alcaloïde, redissolution très rapide rendant difficile l'exécution du cliché.

Prélèvement après 5 jours de germination : essai positif.

Germination prolongée sur une petite quantité : essai négatif.

Analyse chimique. — Nous utilisons, pour tous les examens chimiques, la technique décrite pour le dosage de l'hordénine :

1^{re} expérience sur 15 g : 3,7 mg. — Fusion : + 118° C. Réactions de MILLON et DENIGÈS positives. — Hordénine nette.

2^e expérience : sur 10 g, nous avons caractérisé l'hordénine par le silico-tungstate jaune chamois, caractéristique.

Conclusion. — Présence d'hordénine; cet alcaloïde n'avait encore jamais été signalé dans cette plante.

ELYMUS ARENARIUS L. (Elyme des sables).

La plante présente de longs rhizomes traçants qui retiennent le sable des dunes. Les feuilles sont allongées, dressées et raides, piquantes au sommet. Les épis présentent des épillets à nombre de fleurs variable : 2 à 6.

Examen chimique des racines. — Sur une prise d'essai de 6,15 g de matière sèche, par application de la méthode de STASS : aucun alcaloïde.

Examen chimique des rhizomes. — Prise d'essai : 150 g on obtient 1,9 mg d'une huile jaunâtre, incristallisable.

Germes. — Dans 3 cuvettes de porcelaine on place respectivement 0 kg 300, 0 kg 400 et 0 kg 300 de graines auxquelles on ajoute de l'eau de chaux en quantité suffisante pour les recouvrir. Après une trempe de 24 heures suivie d'une aération de 15 heures, on réalise une seconde trempe de 26 heures avec de l'eau distillée.

Très peu de graines paraissent en état de germer; de plus, le développement de ces dernières est très lent. Après

6 mois nous ne possédons que 4,5 g de germes secs. 7 g de graines seulement sur un kilogramme ont germé.

Examen microchimique : après 15 jours et deux mois, avec le réactif de MAYER, légère précipitation, mais ne disparaissant pas par redissolution comme dans le cas de l'Orge.

Analyse chimique : sur 4 g, aucun résultat.

Nous estimons que seule l'analyse sur une quantité plus importante de germes pourrait trancher la question.

TRITICUM SATIVUM Lam. (Blé, Vilmorin 29).

Un kilogramme de graines réparties en 2 cuvettes; trempe 22 heures; aération 14 heures; trempe 24 heures. Arrêt après 3 jours de germination (1).

Germes : 33,2 g.

Blé malté : 840 g.

Les germes, presque exclusivement formés de radicules, sont plus gros que ceux de l'Orge; leur couleur est également, dans les mêmes conditions de dessiccation, plus foncée.

Examen microchimique : après 3, 4, 8, 15 jours de germination. Essais avec réactifs de MAYER et MAYER-dilué négatifs.

La planche V montre précisément ce que l'on observe dans un cas négatif, par opposition à l'exemple du Millet : Planche I, A.

Analyse chimique : prise d'essai 30 g. Nous obtenons 4,7 mg d'un produit de nature stérolique (réaction de LIEBERMANN positive).

SECALE CEREALE L. (Seigle d'hiver de Brie).

Un kilogramme en 2 cuvettes. Trempe de 20 heures; aération de 14 heures; trempe de 24 heures.

La germination se fait très rapidement : le stade le plus comparable à celui de l'Orge de malterie s'obtient en 48 heures.

Germes : 60 g.

Seigle malté : 821 g.

(1) Nous comptons la durée de germination en jours, après avoir terminé la deuxième trempe.



Radicelle de Blé + réactif de Mayer.
Absence d'alcaloïde $\times 130$.

La couleur des radicelles est beaucoup plus foncée que dans le cas de l'Orge.

Examen microchimique : après 2, 4 et 8 jours, tous examens négatifs.

Analyse : prise d'essai : 55 g.

On obtient 9 mg d'un produit huileux précipitant faiblement avec les réactifs généraux des alcaloïdes mais ne renfermant pas d'hordénine.

LOLIUM PERENNE L. (Ray grass).

Germination sur 1 kilogramme. Trempe 22 heures; aération 12 heures; trempe 24 heures. Arrêt de la germination après 11 jours de germination.

Germes : 66 g.

Ray grass malté : 582 g.

Examen microchimique : après 8 et 11 jours négatifs.

Analyse : prise d'essai : 63 g.

On obtient 15 mg d'un liquide jaune. Pas d'hordénine.

POA COMPRESSA L. (Paturin).

Germination sur 1 kg. Trempe 24 heures; aération 12 heures; trempe 24 heures. Arrêt après 12 jours de germination.

Germes : 3 g.

Poa malté : 847 g.

Examen microchimique : sur radicelles de 8 et 11 jours : essais négatifs.

Analyse : prise d'essai : 2,3 g; pas d'hordénine.

DACTYLIS GLOMERATA L. (Dactyle pelotonné).

Germination portant sur 1 kg de graines. Trempe 24 heures; aération 12 heures; trempe : 24 heures. Arrêt après 11 jours de germination.

Germes : 58 g.

Dactyle malté : 733 g.

Examen microchimique : après 8 et 11 jours : essais négatifs.

Analyse : prise d'essai : 53 g.

On obtient 12 mg d'une substance huileuse, incristallisable et de nature stérolique.

ORYZA SATIVA L. (Riz).

Germination sur 1 kg de Riz sec non plus dans le laboratoire souterrain à $+ 16^{\circ}$ mais dans un thermostat à $+ 29^{\circ}$. Trempe de 24 heures avec de l'eau de chaux, puis on remplace celle-ci par de l'eau distillée; on laisse les graines submergées. Arrêt après 11 jours de germination.

Germes : 33,3 g.

Riz : 802 g.

Examen microchimique : des essais ont été effectués sur deux variétés :

1^o Riz sec précédent :

Après 4 jours de germination : négatif.

Après 11 jours de germination : négatif.

2^o Riz de Piémont :

Après 4 jours : légère précipitation non alcaloïdique.

Après 8 jours : négatif.

Analyse :

1^o sur une prise d'essai de 10 g : négatif.

2^o sur une prise d'essai de 23 g : négatif.

AVENA SATIVA L. (Avoine).

Un kilogramme d'Avoine d'hiver est mis à germer à $+ 16^{\circ}$. Trempe 22 heures; aération 14 heures; 2^e trempe 24 heures. Arrêt après 5 jours de germination.

Germes : 9,7 g.

Avoine maltée : 894 g.

On remarque le faible rendement en germes.

Examen microchimique : Après 5, 8, 9 jours de germination : négatif.

Les cellules de coiffe fournissent un fort précipité. Dans la région de multiplication cellulaire intense, où se localise habituellement l'hordénine, pas de précipitation sauf dans quelques très rares cellules.

Analyse : Prise d'essai 9 g.

On obtient 2,8 mg d'un produit donnant nettement la réaction de LIEBERMANN (stérols). Le produit donne aussi

une légère coloration rose avec le réactif de MILLON mais nous avons dit plus haut qu'il était difficile d'éviter la présence de très petites quantités de matières protidiques. Par ailleurs, ni hordénine ni autre alcaloïde.

HOLCUS LANATUS L. (Houque laineuse).

Germination sur 0 kg 600. Trempe 24 heures; aération 12 heures; trempe 24 heures. Arrêt après 8 jours.

Germes : 38 g.

Houque maltée : 446 g.

Examen microchimique : germes de 5 et 8 jours : négatif.

Analyse : Prise d'essai : 36 g. Pas d'hordénine.

BROMUS PRATENSIS Lam. (Brome des prés).

Germination sur 0 kg 600. Trempe 24 heures; aération 12 heures; trempe 24 heures. Arrêt après 12 jours de germination.

Germes : 57 g.

Brome malté : 443 g.

Examen microchimique : sur germes de 9 et 11 jours : négatif.

Analyse : prise d'essai : 54 g.

On obtient 5,2 mg d'une huile incristallisable. Pas d'hordénine après tentative de purification.

ARUNDO ARENARIA L. (Oyat courbet, Roseau des sables).

Germination sur 1 kg. Trempe 24 heures; aération 16 heures; trempe 26 heures. Comme l'Elyme des sables dont il est très voisin, l'Oyat présente un pouvoir germinatif très faible.

Les rares graines (une dizaine) capables de germer, donnent des plantules se développant avec une extrême lenteur.

Examen microchimique : après 3 semaines et 4 mois : quelques précipitations d'interprétation difficile, identiques à celles observées dans l'Elyme.

Analyse : n'a pu être pratiquée, les germes étant en trop petite quantité.

AGROSTIS DISPAR Hort. Par. (Agrostis d'Amérique).

Germination sur 1 kg. Trempe 22 heures; aération 12 heures; trempe 24 heures. Arrêt après 7 jours de germination.

Germes : 14 g.

Agrostis malté : 850 g.

Examen microchimique : après 5 et 7 jours : négatif.

Analyse : prise d'essai : 13 g.

On obtient 3,5 mg d'un produit ayant tendance à cristalliser mais non alcaloïdique. Pas d'hordénine.

PHLEUM PRATENSE L. (Phléole des prés).

Germination sur 1 kg. Trempe 24 heures; aération 12 heures; trempe 24 heures. Arrêt après 5 jours de germination.

Germes : 54 g.

Phléole maltée : 745 g.

Examen microchimique : après 5 et 8 jours : essais négatifs.

Analyse : Prise d'essai : 50 g.

On obtient 22 mg d'un produit stérolique. Pas d'hordénine.

ALOPECURUS PRATENSIS L. (Vulpin des prés).

Germination sur 0 kg 700. Trempe 24 heures; aération 12 heures; trempe 24 heures. Arrêt après 11 jours de germination.

Germes : 29 g.

Vulpin malté : 355 g.

Examen microchimique : sur germes de 8 et 11 jours : négatif.

Analyse : prise d'essai : 25 g.

On obtient 5,1 mg d'une huile incristallisable, de nature non alcaloïdique.

ANTHOXANTHUM ODORATUM L. (Flouve odorante vivace).

Germination sur 1 kg. Trempe 22 heures; aération 12 heures; trempe 24 heures. Arrêt après 11 jours de germination ;

Germes : 109 g.

Flouve maltée : 744 g.

Examen microchimique : après 8 jours : négatif; après 11 jours : légère précipitation non due à un alcaloïde comme le montre la différenciation par l'alcool à 85°.

Analyse : prise d'essai : 100 g.

On obtient 13,3 mg d'un corps huileux. Pas d'hordénine.

ZEА MAYS L. (Maïs).

Germination sur 1 kg de Maïs blanc des Landes. Trempe 22 heures, aération 12 heures, trempe 24 heures. Arrêt de la germination après 9 jours.

Germes : 11 g.

Maïs malté : 884 g.

Examen microchimique : sur les radicules de 3, 8 et 9 jours : précipité diffus non dû à un alcaloïde.

Analyse : prise d'essai 11 g.

On obtient 3,5 mg d'un produit ayant tendance à cristalliser. Pas d'hordénine.

PANICUM MILIACEUM L. (Millet).

Germination portant sur 1 kg de millet blanc, rond. Trempe 22 heures; aération 12 heures; trempe 24 heures. Arrêt après 4 jours de germination, chaque grain ne présente qu'une seule radicule sortie.

Germes : 79 g.

Millet malté : 795 g.

Examen microchimique : sur germes de 4 jours avec réactif de MAYER dilué, précipité très net. Planche I, fig. A.

L'alcaloïde est localisé nettement dans la région d'allongement de la radicule. Après traitement par SO^4H^2 à 5 %, 12 heures, le précipité précédent ne peut plus être obtenu. Planche I, fig. B.

Sur germes de 15 jours : précipitation encore nette.

Analyse : Prise d'essai : 20 g.

Par la méthode habituelle, on extrait 106 mg d'un alcaloïde cristallisé ayant toutes les propriétés de l'hordénine.
F. : + 118° C.

HOLCUS SORGHUM L. (Sorgho à balais, Millet d'Italie).

Germination sur 1 kg: Trempe 24 heures; aération 12 heures; trempe 24 heures. Arrêt après 4 jours de germination.

Germes : 22,2 g.

Sorgho malté : 874 g.

Examen microchimique : après 4 jours de germination : légère précipitation due semble-t-il à un alcaloïde; après 5 jours : précipitation très faible; après 8 jours : négatif.

Analyse : prise d'essai : 20 g.

On obtient 2,1 mg d'un produit non cristallisé précipitant légèrement par les réactifs généraux des alcaloïdes.

IV. — CONCLUSIONS

Nous résumons dans le tableau XXVIII, p. 137, les résultats des recherches précédentes.

Nous voyons que, contrairement à ce que l'on pouvait prévoir, l'hordénine n'est pas très généralisée. Elle paraît constante dans les Orges. Nous avons trouvé, indépendamment de l'auteur japonais dont nous ignorions le travail lors de nos recherches, de l'hordénine dans le Millet. Quant au Sorgho, nous n'avons pas eu la même plante entre les mains.

Cependant, nous ferons remarquer à nouveau qu'une étude comme celle à laquelle nous nous sommes livré est forcément très incomplète. De plus, l'hordénine étant, nous le verrons plus loin dans l'étude de son évolution, un alcaloïde disparaissant assez vite, rien ne prouve que nous ayons étudié les autres plantes au moment opportun.

Revenant sur cette idée que Graminées et Cactées, familles très éloignées, possèdent l'une et l'autre des plantes adaptées à la résistance à la sécheresse, nous avons à tout

TABLEAU XXVIII

Répartition de l'hordénine dans les Graminées.

Sous-famille.	Espèce.	Hordénine caractérisée chimiquement.	Alcaloïde caractérisé micro- chimiquement.
	<i>H. vulgare</i> , L.	1 à 5 ‰	+
	<i>H. murinum</i> , L.	Présence	+
Triticées.....	<i>Elymus arenarius</i> , L.	0	incertain
	Blé.....	0	0
	Seigle.....	0	0
	Ray grass.....	0	0
Festucées.....	Paturin.....	0	0
	Dactyle.....	0	0
Chloridées.....	-----	-----	-----
Oryzées.....	Riz.....	0	0
	Avoine.....	0	0
Avénées.....	Houque.....	0	0
	Brome.....	0	0
Arondinées.....	Oyat.....	0	incertain
Stipées.....	-----	-----	-----
Agrostidées.....	Agrostis.....	0	0
	Phléole.....	0	0
Phléinées.....	Vulpin.....	0	0
Phalaridées.....	Flouve.....	0	0
Maydées.....	Maïs.....	0	0
Panicées.....	Millet.....	Prés. 5 ‰	+
Andropogonées...	Sorgho.....	0	incertain

hasard étudié le suc d'une plante très spécialisée dans ce sens, l'Agave, *Agave americana*, L. (Amaryllidées) :

200 g de suc traités par la méthode de Stass n'ont pas révélé la présence d'alcaloïde non plus que 1 kg 150 de plante entière fraîche traité à part.

Nous devons donc considérer encore maintenant l'hor-dénine comme une substance assez exceptionnelle. Dans les Graminées, elle ne se rencontre avec certitude que dans les plantes suivantes : Orge cultivé, Orge des rats et Millet.

CHAPITRE II

ESSAI D'ANALYSE IMMÉDIATE QUALITATIVE DES RADICELLES D'ORGE

- A. — Tyrosine libre.
- B. — Tyramine.
- C. — Alcaloïdes autres que l'hordénine.

Nous n'effectuons cet essai d'analyse immédiate qu'en vue de l'éclaircissement du passage hypothétique de la tyrosine à l'hordénine, ce qui explique que nous ne cherchions à vérifier que l'existence ou l'absence de certains composés.

A. — TYROSINE LIBRE

Par la technique de dosage de la tyrosine que nous avons établie plus haut, nous avons vu que la *totalité* de cet amino-acide était dosée : tyrosine engagée dans les matières protidiques et tyrosine libre s'il s'en trouve.

C'est ce dernier point que nous envisageons ici. La question mérite d'être posée parce que si l'hordénine provient effectivement de la tyrosine, il est nécessaire que celle-ci modifie dans sa molécule les deux groupements par lesquels elle est précisément engagée dans les protides : la fonction acide et la fonction amine. La décarboxylation comme la méthylation impliquent la sortie de la tyrosine de la molécule protidique. A ce moment la tyrosine est-elle décelable ou se transforme-t-elle immédiatement?

La tyrosine à l'état libre a été signalée dans les germes du Lupin, dans le Dahlia par G. BERTRAND (12) et dans diverses autres plantes. C'est surtout le noircissement à l'air de sections de ces germes, dû à l'action de la tyrosinase, qui a permis cette affirmation.

Dans le cas de l'Orge, on peut observer ce noircissement mais ceci ne nous convainc pas absolument de l'existence réelle de la tyrosine *libre*. Il ne faut pas oublier en effet que la tyrosine est, avec le tryptophane, l'acide aminé le plus labile du complexe protidique; sous l'influence du ferment pancréatique sur l'édestine par exemple, la tyrosine est le premier amino-acide caractérisable.

L'expérience suivante confirme d'ailleurs ce fait. L'action, à *chaud*, sur les matières protidiques du réactif de MILLON provoque l'apparition de la coloration rose comme sur la tyrosine libre. Si nous tentons cette fois la réaction à *froid*, dans les conditions du dosage de O. FOLIN : milieu sulfurique normal, présence de sulfate mercurique et addition d'une solution de NO^2Na , la légumine et l'édestine donnent une réaction positive. Or, ici, l'hydrolyse n'a pu être bien profonde puisque nous opérons à froid et très rapidement.

Nous considérons que la présence de tyrosine libre est probable, mais nous ne pouvons en être absolument sûr.

B. — TYRAMINE

L'existence de cette base dans les radicelles d'Orge a pour nous une grande importance puisque cette substance joue dans notre hypothèse le rôle de pivot.

Dans le but de déceler sa présence ainsi que celle, éventuelle, d'autres alcaloïdes pouvant accompagner l'hordénine, nous préparons un extrait alcoolique de touraillons à partir de 5 kilogrammes de cette substance.

Les radicelles placées dans une allonge de cuivre de 25 litres de capacité sont recouvertes d'alcool à 85°. Après 3 jours de macération, la solution alcoolique, fortement colorée est soutirée et distillée sous pression réduite et à aussi basse température que possible. L'alcool récupéré, ramené au titre de 85° est réutilisé pour un second épuisement. Après plusieurs répétitions de ce cycle, il a été finalement utilisé environ 75 litres d'alcool par fractions de 15 litres demeurant chacune au contact de la matière première pendant une nuit, entre chaque distillation.

Le résidu final, après évaporation complète de l'alcool, constitue un extrait initial A pesant 3,400 grammes.

Celui-ci, franchement acide, est placé dans un grand flacon et additionné d'éther en vue d'éliminer les corps gras, lécithides et stérols. On soutire l'éther par siphonnage et recommence jusqu'à non-coloration de celui-ci. Les différentes portions d'éther ainsi obtenues, rassemblées et évaporées, constituent un extrait B pesant 81 grammes.

Des lavages du même genre sont effectués à l'aide d'éther de pétrole et l'on obtient après concentration un extrait C pesant 55,4 g.

Les extraits B et C qui contiennent essentiellement les lipides sont étudiés à la fin de ce chapitre, la connaissance exacte des stérols ayant présenté une certaine importance pour la mise au point de la technique de dosage de l'hordénine.

L'extrait A, après délipidation, est fractionné par reprises à chaud au moyen de plusieurs portions de 2 litres d'alcool à 95°; ces opérations sont recommencées 9 fois et les évaporations menées séparément conduisent aux extraits secondaires A_1 , A_2 , ... A_9 .

La recherche de la tyramine, qui nous intéresse tout d'abord, n'est pas aussi simple que l'on pourrait imaginer, en raison des caractères de solubilité de cette substance très voisins de ceux des impuretés l'accompagnant.

Nous avons d'abord tenté d'utiliser la longue technique de A. ULLMANN (135), indiquée au sujet de la préparation de la tyramine à partir des semences de *Carduus Mariae* Crantz. Le principe de la technique consiste à précipiter, dans une solution de l'extrait dans SO_4H^2 à 5 %, la tyramine et les acides aminés au moyen d'acide phosphotungstique. Cette précipitation est effectuée après une défécation préalable à l'acétate de plomb.

Nous nous sommes rendu compte, par des essais préalables, que la tyramine à l'état pur est difficilement précipitée par l'acide phosphotungstique. Par contre, puisque nous sommes, dans nos extraits, en présence d'hordénine, nous nous en débarrassons, ainsi que d'une quantité de produits possédant un azote tertiaire, par une précipitation par l'acide silico-

tungstique. Dans une solution aqueuse acidifiée par 5 % de SO^4H^2 , la tyramine n'est pas précipitée.

Nous partons de 24 g d'extrait secondaire A_1 (pesant 56 g) qui, en raison de sa préparation, doit renfermer le maximum de tyramine. Nous les délayons dans 150 cm^3 d'eau acidifiée par 7,5 g de SO^4H^2 placés dans un pot de centrifugeur de 500 cm^3 . On ajoute alors une solution saturée d'acide silico-tungstique jusqu'à non précipitation. Après centrifugation, la solution limpide est concentrée sous pression réduite jusqu'à sirop clair et neutralisée exactement au moyen de soude.

On procède ensuite à plusieurs épuisements à chaud à l'aide d'alcool amylique jusqu'à non-coloration de celui-ci. En raison de la difficulté d'évaporation de l'alcool amylique à basse température, on épuise chaque fraction avec de la soude à 1 % et l'on répète l'opération à 3 reprises. Les solutions sodiques filtrées sont réunies, faiblement acidifiées par ClH et concentrées dans le vide jusqu'à consistance sirupeuse. On épuise le sirop à l'aide d'alcool éthylique chaud et le résidu final obtenu après évaporation est divisé en deux parties.

1^{re} partie : Cette portion est placée dans le tube à sublimer décrit pour la purification de l'hordénine (fig. 3). On observe après chauffage à 180° dans le vide pendant une nuit, un distillat huileux, jaune clair où quelques cristaux apparaissent après séjour très prolongé dans le vide sulfurique. Nous avons encore purifié deux fois par sublimation ce produit et n'avons finalement obtenu que 7 mg d'un corps légèrement coloré F : + 155-156° C. (fusion tyramine : + 161° C.).

La réaction de MILLON est positive et l'on obtient avec SO^4H^2 formolé la coloration verte que donne le paracrésol.

La *2^e partie* est dissoute dans l'eau et acidifiée par SO^4H^2 dilué jusqu'à pH 2,6. Le liquide est soumis à une électrodialyse de 20 heures sous 120 volts suivant la technique utilisée par TABONE (129) (un essai préliminaire exécuté dans les mêmes conditions sur 37,6 mg de tyramine pure nous avait permis d'en retrouver 23 mg à la cathode, tandis que le bac anodique et le bac central n'en renfermaient pas).

Nous concentrons, après l'opération, le liquide du compartiment cathodique qui donne une réaction de MILLON nette. Nous n'avons pu, après toute une série de purifications, isoler de tyramine cristallisée.

Ainsi, des résultats obtenus dans la 1^{re} partie nous pouvons affirmer la présence de tyramine mais en si petite quantité qu'il est difficile de savoir s'il s'agit de tyramine préexistante dans la plante ou de tyramine de nouvelle formation comme il en apparaît fréquemment au cours du vieillissement des extraits.

C. — ALCALOÏDES AUTRES QUE L'HORDÉNINE

La moitié des extraits A_1 , A_2 et un mélange formé de la moitié des extraits A_3 , A_4 , A_5 , ... A_9 , c'est-à-dire trois prises d'essais pesant respectivement 28, 18 et 98 g sont séparément reprises par de l'eau acidifiée par 5 % de SO^4H^2 devant s'emparer des alcaloïdes.

Les solutions sont lavées à l'éther jusqu'à non-coloration. Les solutions de A_1 et A_2 sont, après concentration, alcalinisées par CO^3Am^2 et épuisées par l'éther chacune dix fois dans les conditions-mêmes du dosage de l'hordénine. L'extrait provenant de A_1 est soumis à des cristallisations fractionnées dans l'alcool qui fournissent finalement et uniquement de l'hordénine : F. + 118° C.

L'extrait provenant de A_2 est soumis à une sublimation dans le vide à + 105° C. Lorsque toute l'hordénine est distillée, on élève la température à + 150° C., puis à + 200° C. De faibles quantités d'un liquide jaunâtre sont obtenues. La purification est impossible et les produits obtenus soumis à l'action des réactifs généraux des alcaloïdes ne fournissent qu'un faible précipité.

Les 2 extraits provenant de A_1 et A_2 , déjà alcalinisés par CO^3Am^2 , sont additionnés de KOH et épuisés 10 fois par l'éther. On n'obtient aucun résidu appréciable.

L'ensemble des extraits $A_3 + A_4 + \dots + A_9$, après concentration est alcalinisé en premier lieu par KOH. Après extractions par l'éther, on ne trouve que des traces d'hordénine (l'hordénine est soluble dans KOH en raison de sa fonction phénolique). On réacidifie par SO^4H^2 puis alcalinise par CO^3Am^2 ; dans ces conditions, on trouve l'hordénine restante.

Ainsi, nous pouvons conclure que l'hordénine est le seul alcaloïde des touraillons. Ce point rapproche plus particulièrement l'Orge de la Cactée *Anhalonium fissuratum* Engelm, où l'hordénine se rencontre seule.

RECHERCHES SUR LA FRACTION LIPIDIQUE

Les extraits B et C, provenant de la délipidation de l'extrait initial A sont remis en solution dans le minimum d'éther et les lécithides sont précipités par addition d'une grande quantité d'acétone. On centrifuge. La partie lécithide précipitée est laissée de côté en raison de la très grande complexité de séparation des principes immédiats et dont l'étude s'écarterait par trop de l'objet de nos recherches.

Par contre, la solution éthéro-acétonique évaporée renferme les stérides et stérols libres; l'étude de cette fraction offre un certain intérêt en raison de la gêne que des corps à réaction de LIEBERMANN positive ($\text{SO}^4\text{H}^2 + (\text{CH}^3\text{CO})^2\text{O}$: coloration verte) risque d'apporter à la purification de l'hordénine par sublimation.

Nous saponifions le résidu (19 g) de l'évaporation de cette solution éthéro-acétonique au moyen de la baryte à chaud. On épuise par le chloroforme s'emparant de l'insaponifiable. Après évaporation, on obtient un résidu cristallisant à la longue et fortement coloré en brun. On purifie par cristallisations répétées dans l'éther de pétrole (seul solvant qui, après de très nombreux essais infructueux, nous ait donné un résultat). On obtient finalement un corps incolore (F : + 156° C.), présentant les réactions colorées des stérols avec une grande intensité.

Notons que l'on trouve assez fréquemment dans la littérature un tel point de fusion pour les Phytostérols des graines de Graminées.

Le stérol isolé se sublime, sous pression réduite, à partir de +120° C. En réalisant la purification de l'hordénine à +105° C., comme nous le conseillons dans notre technique de dosage, le stérol ne peut souiller l'alcaloïde.

Cette précision utile pour le dosage de l'hordénine justifiait la présente étude.

CHAPITRE III

ÉVOLUTION DE L'HORDÉNINE DANS L'ORGE

I. — RECHERCHE DE L'HORDÉNINE DANS L'ORGE, HORS DES RADICELLES

Jusqu'à ce jour, l'hordénine n'a été signalée dans l'Orge que dans les radicules et au cours de la germination. N'existe-t-elle pas dans d'autres parties de la plante?

a) RECHERCHE DE L'HORDÉNINE DANS L'ORGE ENTIER

500 g d'Orge — variété Chevalier — sont pulvérisés et traités suivant les principes du dosage mais en utilisant 5 portions de 2 litres d'eau acidifiée pour les premières extractions.

Après concentration, l'extrait est réparti dans 5 tubes où sont effectués les lavages et les extractions. Tous les liquides étherés sont finalement concentrés dans le même ballon.

Après tentative de sublimation de l'extrait final, nous n'obtenons pas trace d'hordénine.

b) RECHERCHE DE L'HORDÉNINE DANS LES ROGNURES DE FABRICATION DE L'ORGE PERLÉ

Nous effectuons des recherches sur ce matériel pour le cas où une petite quantité d'hordénine située dans les parties externes de la graine n'aurait pu être mise en évidence dans la recherche précédente. Les rognures dont nous disposons sont précisément constituées par le péricarpe, les balles et seulement quelques fragments d'albumen.

Nous partons de 500 g de ces rognures que nous traitons par 10 litres d'alcool à 80°, en cinq fois. La suite de l'analyse est conduite comme précédemment. Ici encore, le résultat est négatif. D'ailleurs, les extraits obtenus dans ce cas comme dans celui de l'Orge complet, non seulement ne renferment pas d'hordénine, mais pas trace d'autre alcaloïde.

c) RECHERCHE DE L'HORDÉNINE DANS LES EMBRYONS
SÉPARÉS D'ORGE

Comme nous le verrons un peu plus loin, l'hordénine apparaissant dans les radicules d'Orge presque dès le début de la germination, nous pouvions craindre qu'une trop grande dilution d'une trace d'hordénine contenue dans les germes n'ait empêché de la trouver.

Nous avons donc séparé, un par un, les embryons de 4.000 graines d'Orge Chevalier.

Une première fraction de 2.000 graines pesant 85 g fournit 2,86 g d'embryons.

Une deuxième fraction de 2.000 graines pesant 84 g fournit 2,73 g d'embryons (rendement d'environ 3,30 %).

Pour extraire l'embryon, la graine est coupée suivant sa longueur; à l'aide d'une aiguille, on fait sauter l'embryon ou les deux portions de celui-ci suivant que la coupe a intéressé ou non le germe.

Le germe, ou le fragment de germe, est accompagné du scutellum, et, plus rarement, de petits fragments d'albumen.

La recherche de l'hordénine dans ce matériel a porté sur 8,59 g de germes préalablement pulvérisés. En l'absence d'amidon, la recherche est facile à conduire et son résultat, encore négatif, nous a convaincu qu'avant toute germination, la graine d'Orge *ne renferme pas d'hordénine*.

Au point de vue biologique, un point important restait à élucider. L'hordénine ne se forme-t-elle pas dans la graine d'Orge dès que commence l'hydrolyse des réserves, pour aller se localiser ensuite dans les radicules? Nous répondons sur ce point par deux expériences : recherche de l'hordénine dans les produits d'hydrolyse de l'Orge et recherche de l'hordénine dans les malts.

d) HYDROLYSE DE L'ORGE

Nous la réalisons au moyen de l'acide sulfurique. Certes, ce n'est pas ainsi que se fait l'hydrolyse des protides, lipides et glucides des réserves de la graine au moment de la germination, mais ce clivage plus brutal peut montrer si quelque constituant protidique de la graine est susceptible ou non de fournir de l'hordénine au même titre qu'un acide aminé quelconque. La grande stabilité de cet alcaloïde en présence de SO^4H^2 , même en solution concentrée et à chaud, nous autorise à tenter l'expérience.

Un kilogramme d'Orge Chevalier est finement pulvérisé au moulin turc électrique. Les balles, qui se séparent plus ou moins, sont repassées plusieurs fois. La poudre totale est placée dans un ballon de 5 litres. On ajoute 3 litres de solution de SO^4H^2 à 25 %. On laisse la masse s'imprégner et agite de temps en temps. Après une heure de macération, on chauffe au bain-marie, à reflux, pendant 20 heures, en agitant toujours de temps à autre. Le liquide est ensuite décanté et l'hydrolyse est reprise avec deux litres de SO^4H^2 à 25 %. Après douze heures, nouvelle décantation et la masse brunâtre restée au fond du ballon est soumise à la presse pour en exprimer le maximum de liquide. Les liqueurs très acides, réunies dans une grande terrine en grès, sont additionnées de baryte non pas jusqu'à précipitation totale de SO^4Ba mais jusqu'à ce que le liquide ne présente plus qu'une faible acidité. On décante la solution de couleur jaune qui surmonte SO^4Ba et on la filtre. La gelée de SO^4Ba est délayée à deux reprises avec 2 litres de SO^4H^2 à 2 ‰. Après repos, on décante et filtre. La bouillie barytique est, après ce dernier lavage, mise à égoutter sur des filtres.

Les liqueurs *légèrement* acides sont concentrées sous pression réduite jusqu'à consistance sirupeuse. Le résidu, pesant 600 g est réparti dans les six tubes cylindriques de l'appareil à extraction (fig. 1). Les extraits sont lavés en milieu acide jusqu'à non-coloration de l'éther (12 lavages sont nécessaires). Après alcalinisation par le carbonate d'ammonium, on effectue 10 épuisements dans chaque

tube, toujours au moyen de l'éther. Dans ces conditions, 30 litres d'éther participent à l'épuisement de l'ensemble de l'extrait et sont récupérés par distillation. Il demeure un résidu huileux pesant 26 g après dessiccation.

Ce résidu ne présente aucun caractère alcaloïdique. La distillation dans le vide d'une portion de celui-ci ne fait pas apparaître d'hordénine.

e) RECHERCHE DE L'HORDÉNINE DANS LE MALT

LÉGER avait tenté cette recherche en raison des applications du malt dont on trouve dans le commerce de nombreuses préparations : sirops et extraits divers. Enfin, par le malt, la question de la présence de l'hordénine dans la bière peut se poser.

La conclusion de LÉGER (88) est que l'hordénine n'existe pas dans le malt. TORQUATI (134) confirme ce résultat. Par contre Yoshitaka HASHITANI (145) isole 0,1978 g d'hordénine à partir de 11,5 kg de malt, ce qui représente une teneur de 0,0017 %.

Devant ces résultats contradictoires, nous reprenons la question. Un kilogramme de malt (1) pulvérisé est traité par le procédé habituel du dosage de l'hordénine et nous isolons 7 mg de cet alcaloïde.

Cependant, en manipulant ce malt sur des feuilles de papier-filtre, nous remarquons qu'il laisse toujours sur ce dernier une fine poussière qui, examinée à la loupe, se révèle formée de petits fragments de radicules; les traitements mécaniques et les ventilations ne parviennent donc pas à débarrasser complètement le malt de ces petits débris de germes. L'hordénine extraite vient-elle ou non de ces poussières?

Nous frottons sur un tamis 3 kg 500 de malt, par petites portions, jusqu'à ce que celui-ci ne laisse plus la moindre trace de poussière sur le papier-filtre. Nous séparons ainsi

(1) Ce malt, ainsi que les touraillons, nous ont été aimablement fournis par les Malteries Franco-Belges par l'intermédiaire de M. SCHOEN, chef du Service des Fermentations à l'Institut Pasteur, que nous sommes heureux de remercier ici.

36 g d'une poussière ayant toutes les apparences d'une poudre de touraillons.

Le dosage de l'hordénine effectué sur la totalité de cette poussière fournit 26,1 mg d'hordénine soit une teneur de 0,72 ‰. Ce chiffre correspond à 7,4 mg par kg de malt et est presque identique à la quantité trouvée par analyse directe du malt non nettoyé (7 mg par kg) (1).

De plus, deux analyses faites sur 500 g et 1 kg de malt ainsi nettoyé ne mettent plus en évidence d'hordénine.

Nous concluons donc que le *malt ne renferme pas d'hordénine* mais qu'il peut être recouvert de poussières de radicules, qui elles en renferment. La présence d'hordénine dans les préparations de malt pourrait donc être constatée éventuellement, mais il ne saurait s'agir que de très petites quantités.

De l'ensemble de ces recherches d'ordre *chimique* sur la localisation de l'hordénine dans l'Orge, nous pouvons conclure que la graine avant et après germination ne renferme pas cet alcaloïde.

II. — ÉVOLUTION DE L'HORDÉNINE DANS LES RADICELLES D'ORGE AU COURS DE LA GERMINATION

Nous avons vu dans la partie historique de ce mémoire que Torquato TORQUATI (134) avait tenté cette étude et voici, dans le tableau XXIX, le résultat de celle-ci :

TABLEAU XXIX

Type du stade de développement.	Quantités d'Hordénine trouvée % de matière sèche.	
	Radicelles.	Gemmules.
1	0,45	
2	0,40	0,10
3	0,10	0,02
4	0,05	traces
5	0,00	0,00

(1) Nous faisons remarquer à ce sujet la sensibilité de notre méthode de dosage qui permet de retrouver 7 mg d'hordénine dans 1 kg de matière première (0,007 ‰), valeur dont l'exactitude est confirmée par l'analyse de la poussière obtenue à partir d'un kg du même malt.

Les types de stade de développement sont définis comme suit :

1 :	long ^r de la gemmule	8 mm,	corresp ^t au	4 ^e jour de germination.	
2 :	—	20 mm,	—	6-7 ^e jour	—
3 :	—	45 mm,	—	9-11 ^e jour	—
4 :	—	80 mm,	—	15-20 ^e jour	—
5 :	—	160 mm,	—	21-25 ^e jour	—

Les chiffres d'hordénine étant rapportés en concentrations % de matière sèche et celle-ci augmentant au cours de la germination, la diminution de l'alcaloïde pourrait n'être due qu'à une dilution. Certes, le chiffre 0 du 5^e stade a une valeur à la fois relative et absolue, mais dans un dosage, ce nombre ne saurait avoir d'autre signification qu'une limite de sensibilité de la méthode. Or, nous avons vu les nombreuses critiques que l'on peut faire à cette dernière.

Pour toutes ces raisons, nous avons cru utile de reprendre la question.

a) PRÉPARATION DE LA MATIÈRE PREMIÈRE

Bien que n'étant qu'une opération en quelque sorte artificielle et ne tendant qu'à réaliser une fabrication industrielle, la germination de l'Orge, telle qu'elle est conduite dans les malteries, peut conduire à d'intéressantes constatations si l'on envisage la formation d'une substance déterminée, comme l'hordénine par exemple.

En gros, de telles germinations se font par simple utilisation des réserves de la graine, en l'absence de tout apport extérieur à l'exception de l'eau et de l'oxygène.

Le fait que notre méthode de dosage n'exige qu'une prise d'essai de l'ordre de 10 g présente un grand intérêt en raison du faible rendement en germes au début de la germination.

Nous opérons dans un laboratoire souterrain, de température constante (+ 16° C.) et dont l'atmosphère est constamment saturée de vapeur d'eau ainsi que le prouve le ruissellement continu de l'eau le long des parois, eau qui va se perdre dans un puisard.

L'Orge utilisé, l'*Hordeum vulgare* L., variété Chevalier est un *Hordeum distichum erectum* α pour la plus grande part. Les graines ont un poids moyen de 43 mg. Cet Orge est

disposé dans de grandes cuvettes en porcelaine, directement en contact avec celles-ci. Chaque cuvette renferme de 500 g à 1 kg d'Orge et chaque lot correspond à une ou plusieurs cuvettes :

Le lot n° 1 : 2 kg 500 de graines.	} Les poids de graines des premiers lots sont d'autant plus importants que le rendement en germes au début de la germination est plus faible.
Le lot n° 2 : 2 kg —	
Le lot n° 3 : 1 kg 300 —	
Le lot n° 4 : 1 kg 200 —	
Le lot n° 5 : 1 kg —	
Le lot n° 6 : 0 kg 800 —	
Le lot n° 7 : 0 kg 800 —	
Le lot n° 8 : 0 kg 700 —	
Le lot n° 9 : 0 kg 500 —	

La première opération que l'on fait subir à ces graines est une imbibition, encore appelée « trempe » en terme de malterie. Celle-ci s'effectue avec de l'eau de chaux, dans le but d'empêcher le développement ultérieur des moisissures (1). Les graines demeurent ainsi entièrement recouvertes pendant 14 heures. Après cette macération, on égoutte sommairement les cuvettes et laisse les graines exposées à l'air pendant 9 à 10 heures en ayant soin de retourner les graines 2 ou 3 fois : c'est la période dite « d'aération ». Enfin, une seconde trempe est effectuée pendant 24 heures, mais avec de l'eau distillée.

Au cours de ces trempes, les graines absorbent environ 35 % de leur poids d'eau.

Après le dernier égouttage, les germinations sont abandonnées, en ayant soin de les retourner deux fois par 24 heures et de les arroser une fois par 24 heures de façon à ce que les graines soient toujours légèrement humides — ce que l'on reconnaît à leur aspect brillant.

Les lots sont arrêtés respectivement après 2, 4, 6, 8, 11, 14, 17, 21 et 30 jours à dater de la fin de la deuxième trempe (à ce moment la plantule paraît à la pointe de la graine mais ne fait pas encore saillie).

(1) Même au cours de germinations prolongées, nous n'avons jamais observé d'invasion de celles-ci.

Cet arrêt est effectué en égouttant à fond les échantillons et en les portant aussitôt à l'étuve à $+ 50^{\circ}$ C. où on les étale très largement. On les retourne très fréquemment pendant les 3 premières heures puis la température est portée progressivement à $+ 65^{\circ}$ C. et maintenue quinze heures. A ce moment, nous vérifions qu'une prolongation du temps de dessiccation ne fait plus diminuer sensiblement le poids des graines germées. Il importe d'ailleurs que l'arrêt de la germination soit assez brutal pour que celle-ci ne se poursuive pas dans l'étuve. Tous les lots ont été desséchés pendant le même temps, afin que nos expériences soient comparables.

L'ensemble malt + plantules est pesé, puis les germes sont séparés des graines par froissage sur un tamis en laiton de numéro approprié. Les germes ou touraillons passent seuls à travers le tamis et les graines parfaitement propres constituent le malt. On note le poids des deux constituants ainsi séparés.

Les 2 premiers lots, n° 1 et n° 2 — ayant subi respectivement 2 et 4 jours de germination — sont exclusivement formés de radicules, les gemmules courtes et épaisses restant adhérentes aux graines. Le 3^e échantillon (6 jours) est le plus voisin des touraillons industriels. Dans les germoirs de malteries, la germination est d'environ 9 jours, soit 3 jours de plus que dans nos expériences en raison de la température un peu plus basse (12 à 13°) utilisée dans l'industrie.

Nous rapportons dans le tableau XXX les données numériques relatives à ces germinations.

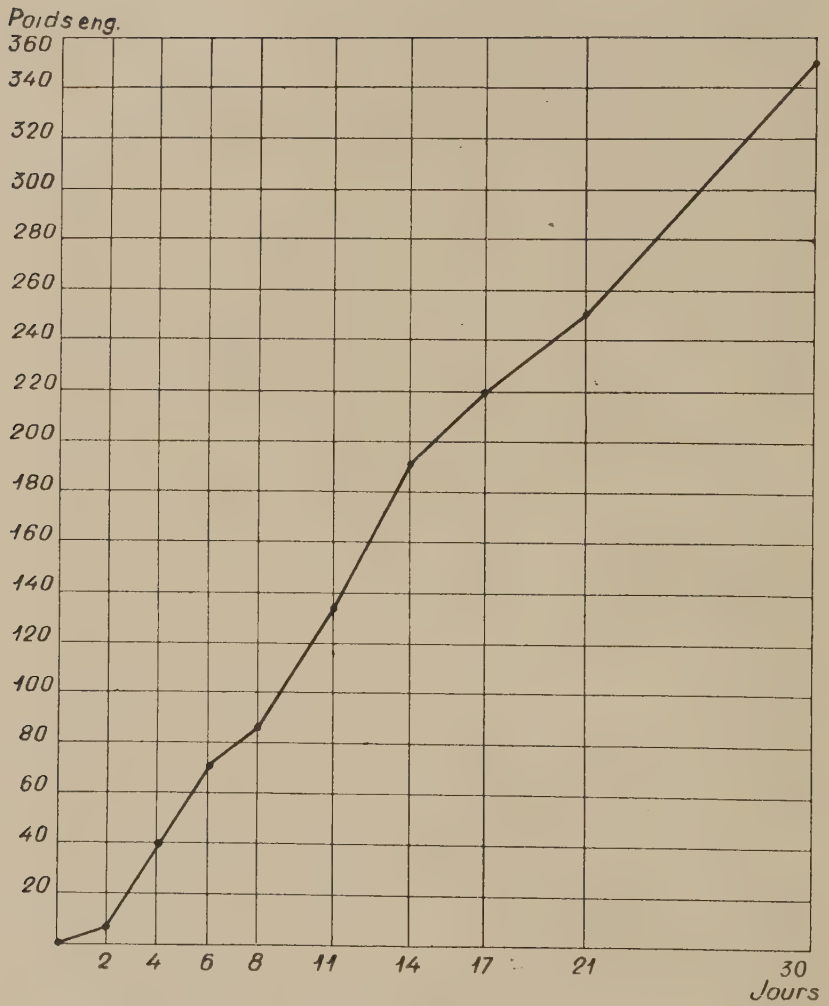
Le graphique V représente les poids croissants de germes obtenus à partir de 1 kg d'Orge en fonction de la durée de germination. C'est la courbe en « S » classique de la croissance sur un substrat non renouvelé.

Le graphique VI rend compte de la perte de poids de l'Orge due à la respiration pendant le même laps de temps. (Cette perte est évaluée dans la dernière colonne du tableau XXX. Le point d'abscisse nulle et d'ordonnée 920 correspond à la dessiccation de l'Orge *non germé*, dans les mêmes conditions que le malt).

TABEAU XXX

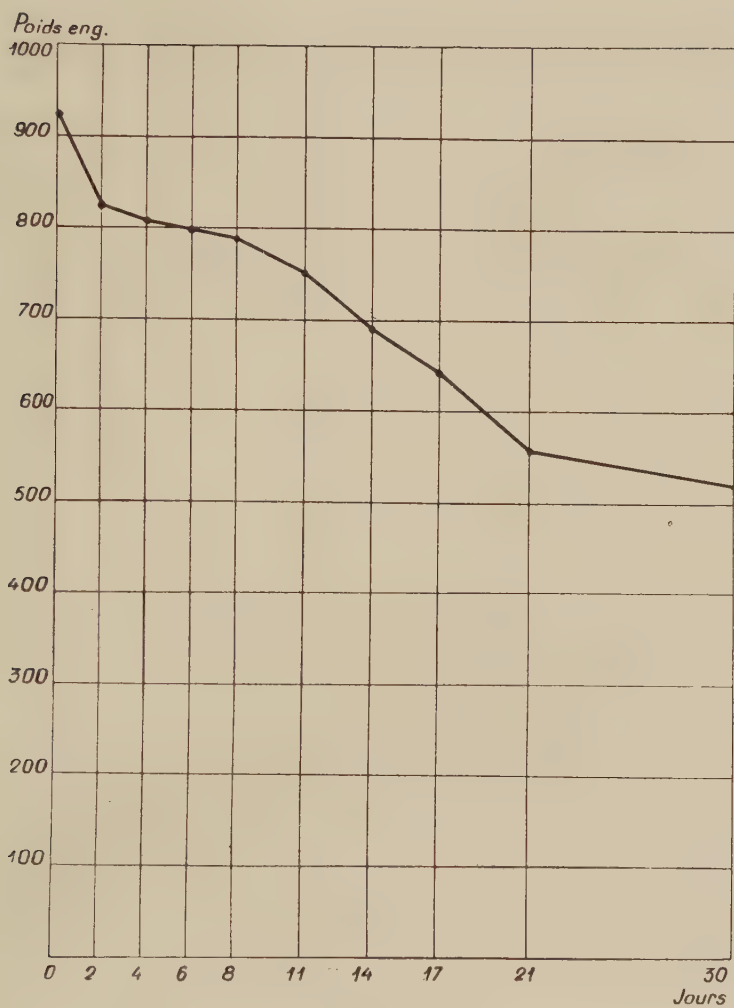
Germination de l'Orge. Variation de poids des plantules et des malts.

Stade	Quantité d'Orge de départ.	Durée germination.	Poids des germes.	Poids des malts.	Rendement en germes.	Rendement en malts.	Rendement total en germes + malts.
	kg	jours	grammes	kg	‰	‰	‰
1	2,500	2	18,7	2,112	7,48	845	852,48
2	2	4	80,7	1,570	40,38	785	825,38
3	1,300	6	92,7	0,950	71,27	730	801,27
4	1,200	8	102,7	0,840	85,58	700	785,58
5	1	11	134	0,618	134,25	618	752,25
6	0,800	14	154	0,396	192,75	495	687,75
7	0,800	17	175,9	0,333	219,87	416	635,87
8	0,700	21	175,5	0,212	250,71	303	553,71
9	0,500	30	175	0,087	350	174	524



Graphique V.

Variation de poids des plantules d'Orge au cours de la germination de 1 kg de graines.



Graphique VI.

Variation de poids de l'ensemble malt + plantules au cours de la germination de 1 kg d'Orge.

b) DOSAGE DE L'HORDÉNINE DANS LES DIFFÉRENTS LOTS

Les dosages effectués suivant la technique décrite plus haut donnent les résultats consignés dans le tableau XXXI :

TABEAU XXXI

Stade.	Durée germination en jours.	Concentration hordénine ‰ de germes.	Quantité absolue hordénine correspondant à 1 kg Orge de départ ; en mg
1	2	1,02	7
2	4	2,94	118
3	6	2,69	191
4	8	2,30	196
5	11	2,10	281
6	14	1,43	275
7	17	1,25	274
8	21	0,60	150
9	30		

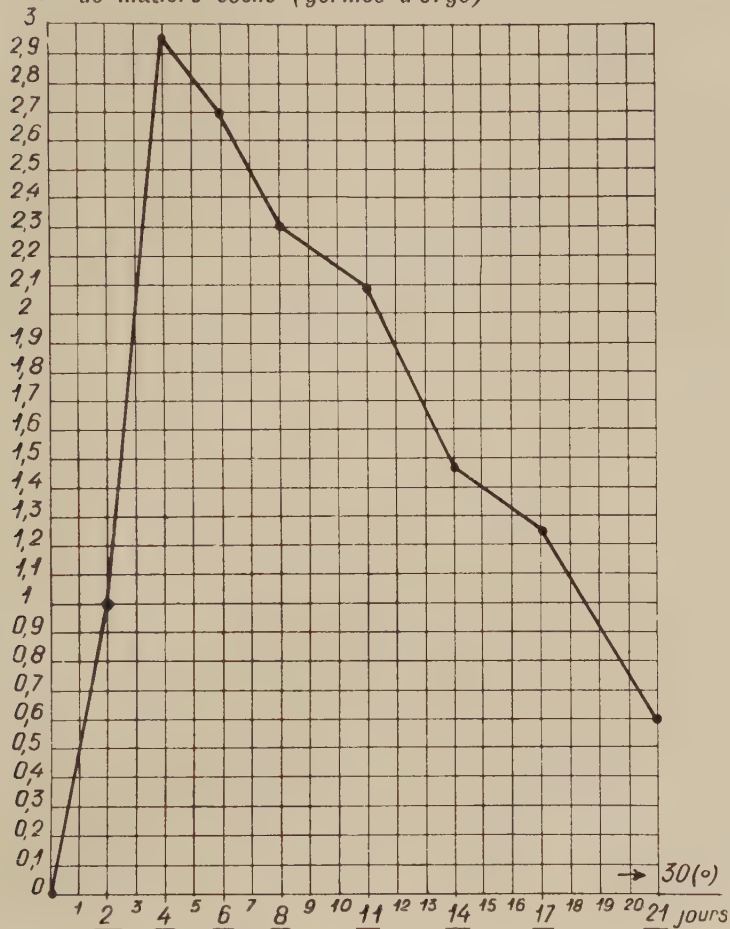
Le graphique VII représente les variations de concentration d'hordénine par rapport à la matière sèche, en fonction du temps, tandis que le graphique VIII montre l'évolution de l'hordénine (en valeur absolue) correspondant à la germination de 1 kg d'Orge. De l'examen de la première courbe, il résulte que la concentration maxima est atteinte très rapidement (après 4 jours). La seconde courbe nous montre que la quantité absolue d'hordénine continue à augmenter jusqu'au 11^e jour puis se stabilise jusqu'au 17^e, à partir duquel cette teneur s'abaisse rapidement pour tomber à 0 après un mois.

TORQUATI, dans le tableau XXIX que nous avons reproduit plus haut, indique de l'hordénine dans les gemmules, en quantité d'ailleurs beaucoup plus faible que dans les radicelles correspondantes.

Nous isolons — ce qui ne peut se faire que par une opération très longue de tri à la pince — les jeunes feuilles des lots nos 2,

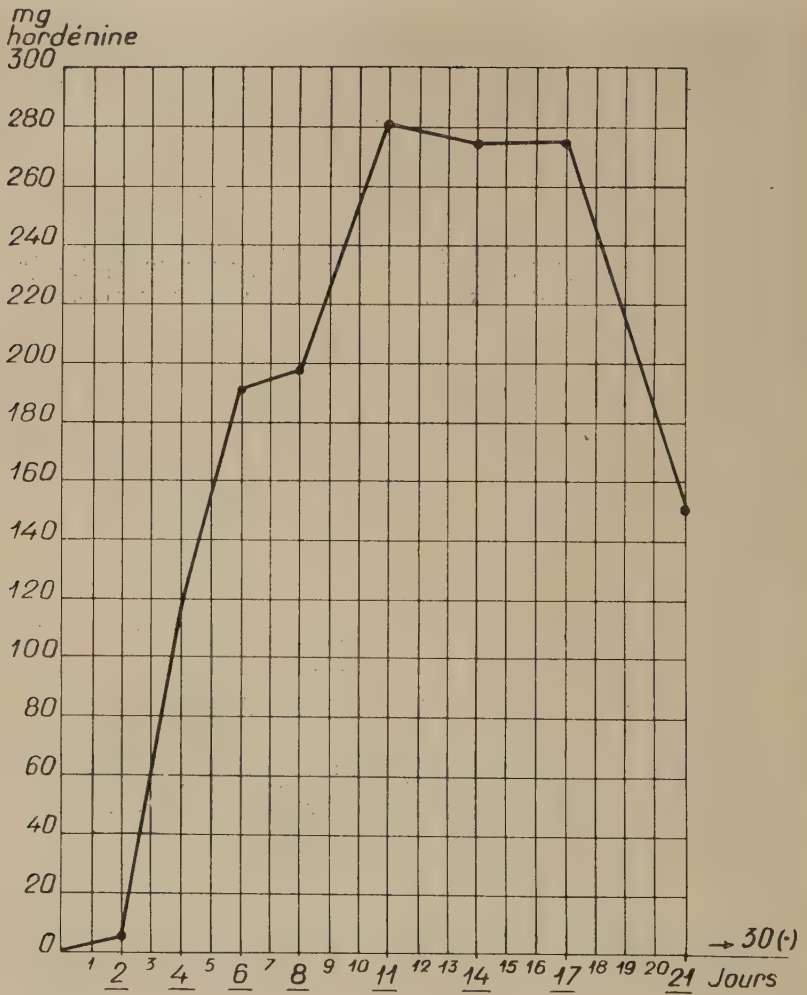
hord.

‰ de matière sèche (germes d'Orge)



Graphique VII.

Concentrations d'hordénine pour 1.000 de plantule sèche à divers stades de la germination de l'Orge.



Graphique VIII.

Variation de la quantité absolue d'hordénine produite par germination de 1 kg d'Orge en fonction du temps.



Radicelle Orge ancien.
Aucun précipité $\times 130$.

5, 6 et 8. Les analyses portent sur des prises d'essai respectivement de 5,6 g, 8, 10 et 12 g. Les résultats sont constamment *nuls*. *Il n'y a donc pas d'hordénine dans les jeunes plantules, en dehors des radicelles.*

Dans le tableau XXXI, les poids des germes obtenus pour chaque stade doivent s'entendre « germes totaux » : *radicelles et jeunes feuilles*. Les trois premiers lots sont presque exclusivement formés de radicelles, mais les lots suivants renferment des quantités croissantes de jeunes feuilles. Les concentrations sont données par rapport à la totalité de la plantule, mais il doit rester bien entendu que l'hordénine se trouve uniquement dans les radicelles.

Nous concluons donc de ces expériences que l'hordénine ne *préexiste pas* dans les graines avant germination, mais qu'elle apparaît dès le début de celle-ci, d'une façon transitoire et dans les radicelles seulement.

c) VÉRIFICATION DES RÉSULTATS PRÉCÉDENTS
PAR L'EXAMEN MICROCHIMIQUE

L'examen microchimique des radicelles aux divers stades de leur développement montre que l'hordénine est *toujours localisée* dans les cellules du tissu en voie de multiplication intense situé à une petite distance au-dessus de la coiffe. Ce tissu étant de moins en moins développé quand la germination se prolonge, l'hordénine diminue de ce fait et cette observation est vérifiée par l'analyse chimique.

Une radicelle âgée de 1 mois : Planche VI, ne présente plus trace de précipitation par le réactif de MAYER.

III. — GERMINATION DE L'ORGE
EN PLEINE TERRE

Reste en effet à voir si, dans les conditions de vie normale de la plante, *en pleine terre*, l'hordénine apparaît et se comporte comme dans la germination sans apport de substance nutritive, à l'obscurité, telle qu'elle est conduite dans la fabrication du malt.

S'étant posé la même question, Yoshitaka HASHITANI fit germer de l'Orge sur du sable lavé à l'acide chlorhydrique,

à la soude puis à l'eau. Nous ne voyons pas, quant à nous, en quoi un tel support pouvait différer d'une cuvette en porcelaine. Il opéra, il est vrai, à la lumière dans certains cas, mais de telles germinations ne pouvaient donner de résultats bien différents de ceux obtenus dans les conditions de malterie.

Nous avons semé en pleine terre, au mois d'avril, 190 g d'Orge Chevalier représentant environ 3.650 graines. En raison des difficultés de récolte, trois récoltes seulement furent prévues et, pour cette raison, les graines séparées en trois lots :

1^{er} lot : 115 g représentant environ 2.200 graines.

2^e lot : 65 g — 1.250 —

3^e lot : 10 g — 200 —

Les graines furent semées une à une en enfonçant chacune à 3 cm de profondeur, à l'aide d'un plantoir. La première récolte eut lieu le 7^e jour et, si l'on compte un temps d'imbibition de 48 heures le type de germination était assimilable à celui d'une durée de 5 jours en malterie. La deuxième récolte eut lieu le 12^e jour et la 3^e, beaucoup plus tard, après la 14^e semaine de végétation.

Le tableau XXXII donne les caractéristiques numériques de cette germination. Dans le cas des stades 2 et 3, les jeunes feuilles ont été séparées des racines car elles renfermaient de la chlorophylle gênant le dosage. Une telle séparation était inutile pour le 1^{er} stade puisque les racines seules étaient sorties de la graine.

TABLEAU XXXII

Stade	Quantité Orge au départ.	Nombre de graines.	Durée de végétation.	Poids des germes.	Poids des malts.
1	115 g	2.200	5 jours	9 g	73 g
2	65 g	1.250	12 —	9 g	12 g
3	10 g	200	98 —	32 g	3 g

Les dosages d'hordénine, conduits suivant la technique habituelle, ont donné les résultats indiqués dans le tableau suivant :

TABLEAU XXXIII

Stade	Concentration d'hordénine ‰	Quantité absolue d'hordénine pour 1 kg Orge départ.
1	2,26	181 mg
2	0,71	87 mg
3	...	...

Les graphiques IX et X donnent d'une façon rudimentaire, en raison du petit nombre de points, l'aspect de cette évolution. Celle-ci est, en gros, analogue à celle que l'on constate dans la germination à l'obscurité, que nous avons étudiée en détail plus haut.

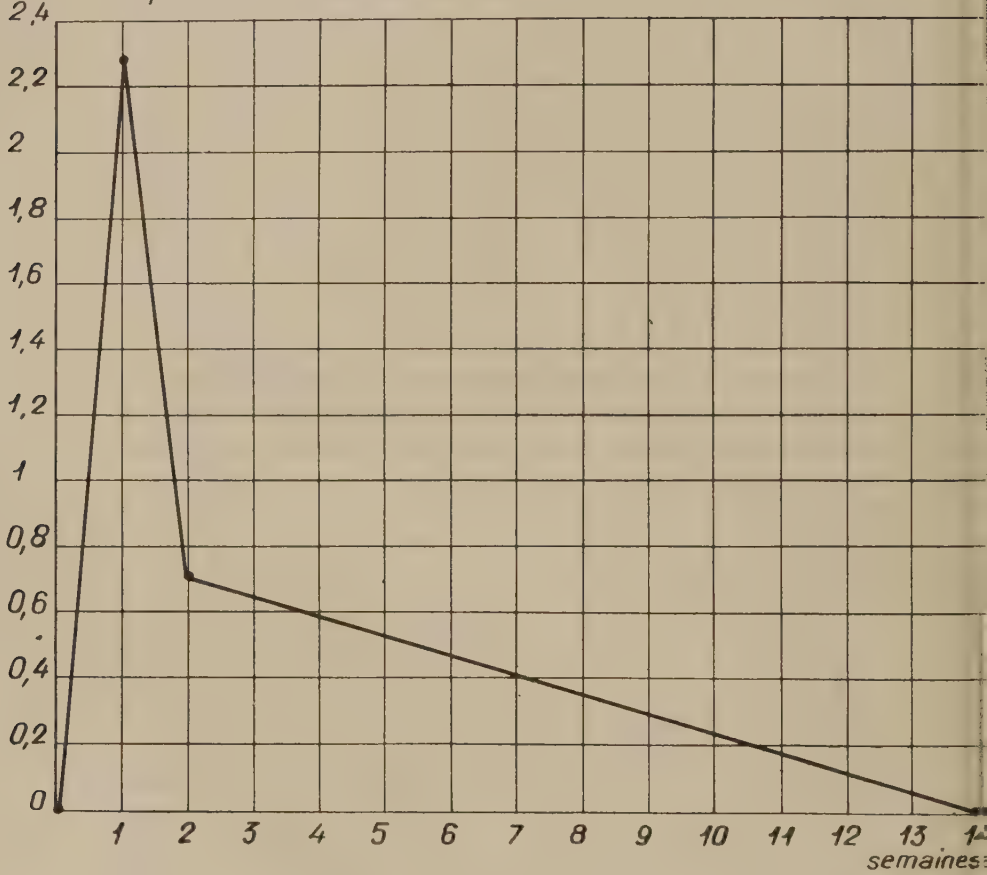
Le résultat le plus intéressant de cette expérience est que l'on ne peut considérer l'apparition de l'hordénine dans les touraillons comme un phénomène artificiel. L'hordénine est un alcaloïde *normal* quoique fugace des racines d'Orge. La question de son origine et de son rôle a donc un sens biologique.

IV. — INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE DE GERMINATION SUR LA FORMATION D'HORDÉNINE

Il nous est apparu, d'après les résultats fournis par la germination de l'Orge dans le souterrain à + 16° C., que la concentration la plus forte de l'alcaloïde dans les radicules ne dépassait pas 2,94 ‰ au cours de nos expériences, alors que les touraillons industriels — utilisés en particulier pour la mise au point de la technique de dosage — présentaient une teneur de 6,5 ‰. Or, dans les malteries, la température de germination n'est que de 12 à 13°.

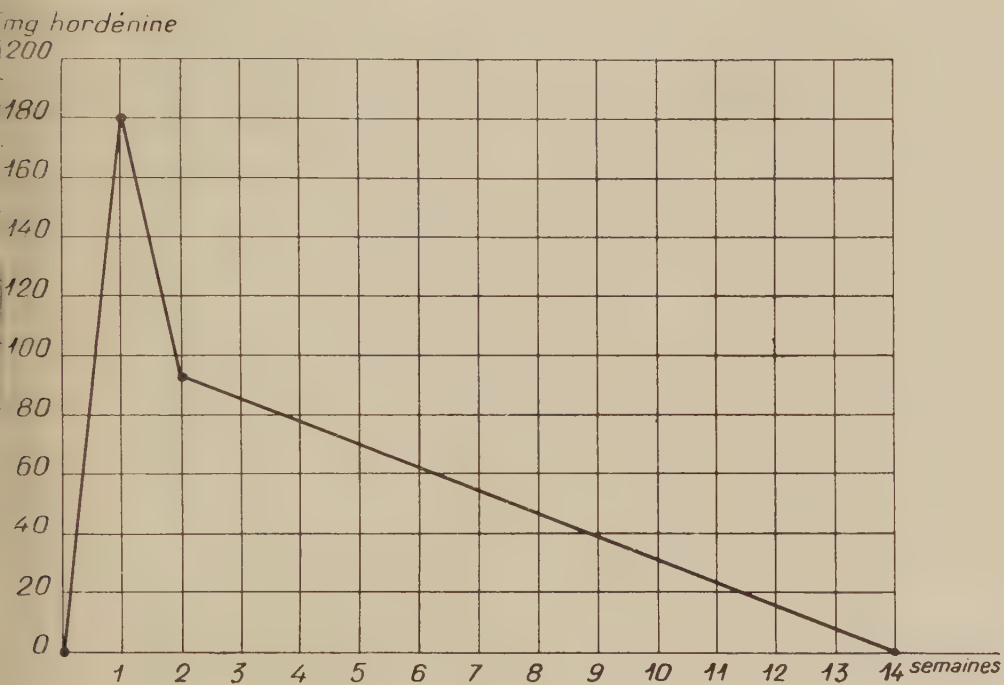
C'est pour cette raison que notre échantillon n° 3 (6 jours de germination) paraît identique au point de vue développement aux échantillons industriels âgés de 10 jours. La comparaison est rendue facile du fait que l'échantillon commercial ne renferme pas de gemmules (appelées « hus-

hordénine pour 1000 de racines sèches



Graphique IX.

Concentrations d'hordénine pour 1.000 de radicelles sèches au cours de la germination de l'Orge en pleine terre.



Graphique X

Variation de la quantité absolue d'hordénine produite par germination en pleine terre de 1 kg d'Orge en fonction du temps.

sards », dans la pratique de la malterie) non plus que notre échantillon n° 3. Par contre, l'échantillon n° 4 en renferme un certain nombre, bien qu'âgé seulement de 8 jours.

On pouvait donc penser que les transformations de produits azotés aboutissant à l'hordénine sont moins activées par une élévation de température que ne l'est globalement l'augmentation de poids de la matière sèche.

Pour le vérifier, il aurait fallu réaliser une germination aux environs de $+ 10^{\circ}$ C. Ne possédant pas d'enceinte à cette température nous avons fait une expérience limite à $+ 5^{\circ}$ C. Malheureusement, dans ces conditions la germination est si lente que toute comparaison devient difficile.

200 g d'Orge fournissent ainsi après 28 jours de germination 3 g de touraillons (malt : 177 g).

La concentration en hordénine est de 2,25 ‰ et la quantité absolue correspondant à 1 kg d'Orge de départ, de 33,5 mg.

Le mécanisme donnant naissance à l'hordénine dépend en tous cas du stade de développement et non du temps absolu de germination puisque, après 28 jours, si l'on opérait dans les conditions normales, il n'y aurait plus d'hordénine.

CHAPITRE IV

ÉVOLUTION DE LA TYROSINE AU COURS DE LA GERMINATION DE L'ORGE

Nous avons tout d'abord dosé la tyrosine, par la méthode décrite dans la II^e partie, Chapitre II, dans les radicelles préparées en vue du dosage de l'hordénine. Nous nous sommes rapidement aperçu de l'insuffisance de cette seule détermination. En effet, l'hordénine peut aussi bien provenir de la tyrosine de la graine que de la fraction de cet acide aminé déjà parvenue dans la radicelle. Pour cette raison, nous avons analysé à chaque stade, les malts correspondants de manière à obtenir un véritable bilan de la tyrosine totale d'une graine — ou ce qui revient au même, de la tyrosine totale d'un kilogramme d'Orge — au cours de la germination (voir tableau XXXIV).

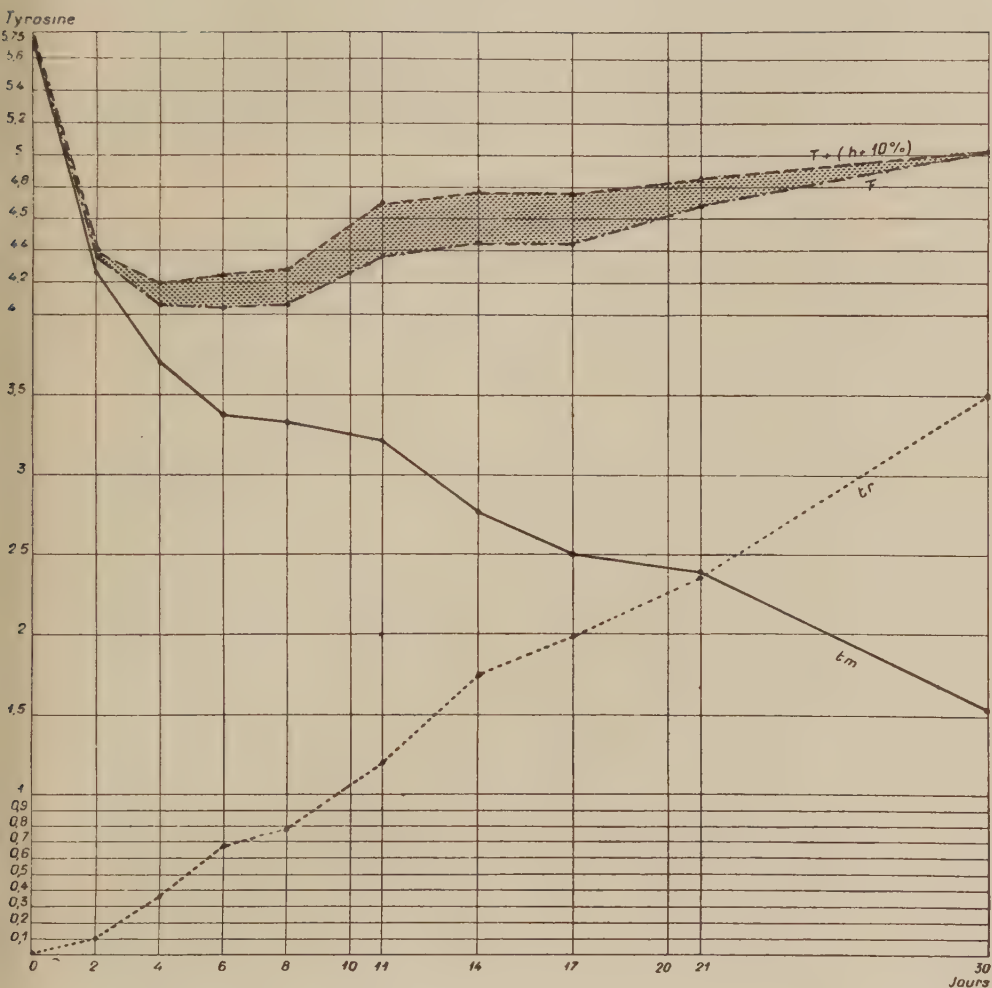
Dans ce tableau, nous rappelons dans une colonne les valeurs d'hordénine précédemment trouvées et, dans la colonne voisine, ces mêmes valeurs augmentées de 10 %; ces derniers chiffres représentent la quantité de tyrosine pouvant être considérée éventuellement comme substance-mère de notre alcaloïde. En effet, une molécule de tyrosine, soit 181 g est *théoriquement* capable de donner, par décarboxylation et diméthylation, une molécule d'hordénine, c'est-à-dire 165 g de cette substance, ce qui représente une différence d'environ 10 %.

La courbe t_r du graphique XI montre que la tyrosine absolue des radicelles croît en fonction du temps suivant une courbe très voisine de celle de l'augmentation de poids (graphique IV), ce qui se comprend aisément, la tyrosine étant un acide aminé constitutif de la matière protidique. Pendant le même temps, la courbe t_m montre que la tyrosine demeurant à chaque instant dans la graine baisse d'une

TABLEAU XXXIV
Variation de la tyrosine au cours de la germination de l'Orge.

Stade.	Age en jours.	Concentration ‰		Teneurs absolues à partir 1 kg Orge au départ					Rapport H + 10 %	
		Radicelles.	Malts.	Radicelles.	Malts.	Total radicelles + malts.	Déficit tyrosine.	Hordénine.	Hordénine + 10 %.	D (1)
Orge.....			5,75			5,75				
Embryons.			12,62			0,414				
1	2	11,81	5,06	0,088	4,275	4,363	1,387	0,0076	0,008	0,05
2	4	8,69	4,75	0,351	3,729	4,080	1,670	0,119	0,131	0,78
3	6	9,40	4,63	0,670	3,380	4,050	1,700	0,192	0,211	12
4	8	8,92	4,73	0,763	3,311	4,074	1,676	0,196	0,216	13
5	11	8,81	5,18	1,196	3,201	4,397	1,353	0,282	0,310	23,7
6	14	8,44	5,55	1,726	2,747	4,473	1,277	0,275	0,303	23,6
7	17	9	6	1,979	2,496	4,475	1,275	0,274	0,302	23
8	21	9,34	7,81	2,342	2,366	4,708	1,042	0,150	0,165	15,8
9	30	10,03	8,84	3,511	1,538	5,049	0,701			

(1) D : déficit de tyrosine.



Graphique XI.

Variation de la tyrosine des radicelles *tr*, de la tyrosine des malts *tm* et de la tyrosine totale *T* au cours de la germination de l'Orge.

La région ombrée représente la proportion dans laquelle l'hordenine peut compenser la perte de tyrosine.

façon régulière. La tyrosine totale, somme des deux quantités précédemment envisagées, est représentée par la courbe T. Or cette tyrosine totale *baisse* très rapidement au début de la germination, comme si une certaine quantité était détruite. A partir du 4^e jour, on observe une stabilisation jusqu'au 8^e jour; à ce moment, la tyrosine totale *augmente* d'une façon régulière. Après un mois, elle n'a toutefois pas encore atteint sa valeur initiale.

Que devient la tyrosine qui disparaît?

Au début de la germination, nous pouvons supposer qu'elle donne naissance à l'hordénine — suivant notre hypothèse — mais lorsque nous examinons, à chaque stade, la quantité théorique de tyrosine à laquelle correspond l'hordénine apparue, nous voyons que celle-ci ne compense que *partiellement* le déficit constaté. La région ombrée comprise entre la courbe T et $T + (h + 10 \%)$ représente la proportion dans laquelle le déficit de tyrosine peut s'expliquer par la formation d'hordénine. Cette mesure oscillant entre 0,05 et 23,7 % n'est toutefois pas négligeable.

La diminution de la tyrosine au début de la germination est en accord avec la diminution parallèle, souvent constatée par certains auteurs, des matières protidiques totales. La notion paraissant plus nouvelle est le relèvement qui se produit par la suite, comme si, en raison de l'épuisement des réserves, la plante tendait à une réutilisation plus intense des produits de morcellement de l'hydrolyse pour reconstruire l'acide-amino. Parmi ces produits dégradés possibles se trouve l'hordénine car il est intéressant de remarquer qu'elle tend à disparaître précisément au moment où la teneur en tyrosine totale se relève.

Si l'hordénine demeure une de ces substances possibles et même probables provenant de la tyrosine disparue, elle n'est pas la seule. Nous avons vu que la tyramine juste décelée qualitativement ne paraît pas intervenir; il existe certainement d'autres corps voisins dont la connaissance permettrait de résoudre le problème.

On peut même penser que ces substances restent malgré tout assez voisines de la tyrosine initiale puisqu'elles peuvent la reconstruire facilement à la fin de la germination.

CHAPITRE V

ÉVOLUTION DE L'AZOTE PROTIDIQUE AU COURS DE LA GERMINATION DE L'ORGE

Pour les mêmes raisons que dans le cas de la tyrosine, l'azote protidique est dosé *à la fois* dans les radicelles et dans les malts.

Le tableau XXXV rend compte des valeurs trouvées; nous les indiquons suivant l'habitude en concentrations et valeurs absolues.

Si l'on examine sur le graphique XII le dessin de cette évolution, on constate que l'azote protidique des radicelles, *Nr*, suit la croissance en « S » de tout élément plastique à partir d'un milieu nutritif limité. L'azote protidique des malts *Nm* baisse d'une façon symétrique (remarquer l'allure des 2 courbes *Nr* et *Nm* images l'une de l'autre par rapport à un miroir plan parallèle à l'axe des temps).

L'azote protidique total, somme des deux précédents est représenté par la courbe *Nt*; au début de la germination, il baisse d'abord rapidement puis lentement. Cette perte d'azote a été fréquemment remarquée par certains auteurs dans des cas analogues : dosages d'azote dans les capsules de Pavot et expériences de nutrition des Phanérogames à l'aide d'alcaloïdes (CLAUTRIAU).

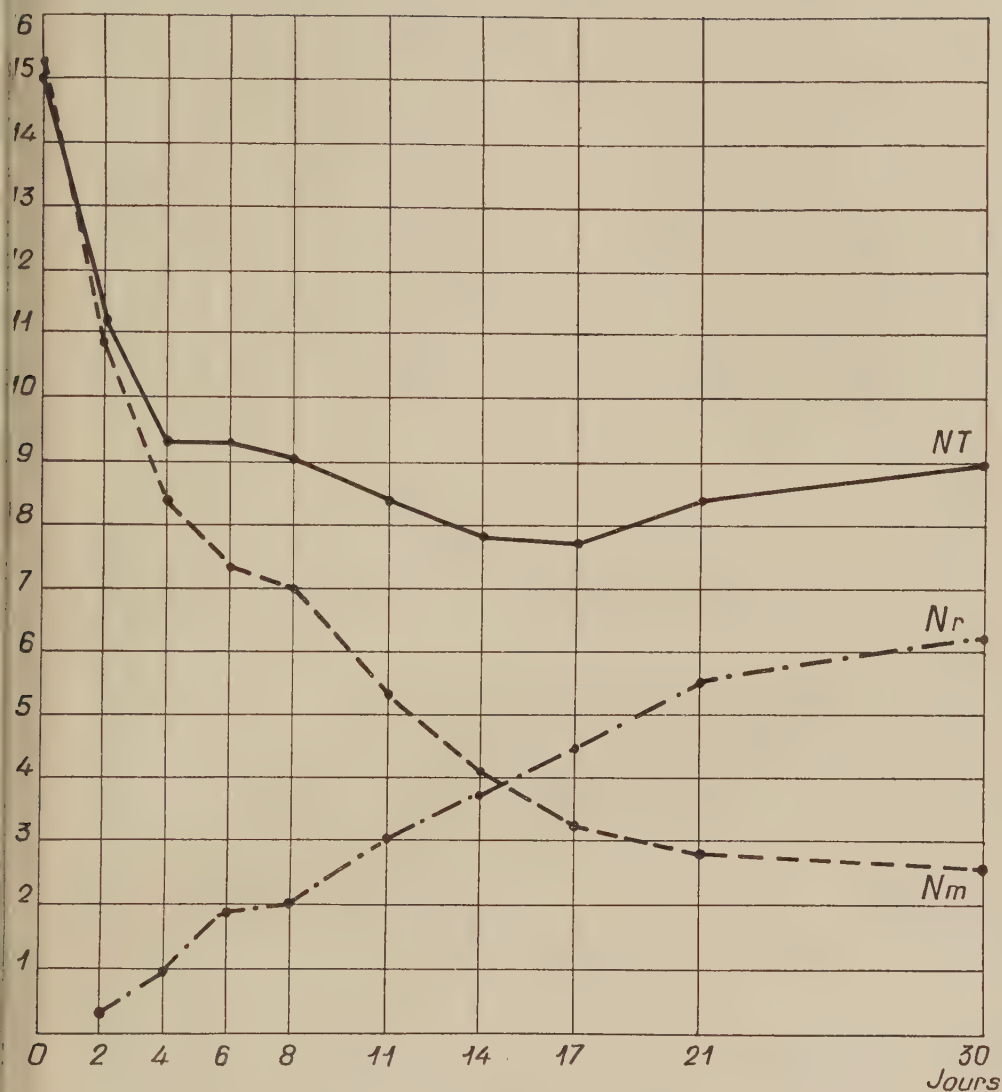
Il est plus curieux de remarquer qu'à partir du 17^e jour de germination, cet azote *augmente à nouveau*, comme l'avait fait, mais un peu plus tôt, la tyrosine. Il semble que le végétal dont les réserves s'épuisent utilise plus intensément tout ce dont il dispose pour la construction de sa matière vivante et, en particulier, les fragments de dégradation qu'il a peut-être inconsidérément multipliés au début de la germination.

Quant à l'azote disparu, nous n'avons pas fait de recherches sur sa nature. Il doit se retrouver en partie dans les

TABLEAU XXXV
Variation de l'azote protidique au cours de la germination de l'Orge.

Stade.	Age.	Concentration ‰		A partir 1 kg Orge départ. Teneur absolue		N protidique. Total.
		Radicelles.	Malts.	Radicelles.	Malts.	
Orge..... Embryons.		15,15 49		15,15 1,607		15,15
1	2	36,40	12,95	grammes 0,273	grammes 10,942	grammes 11,215
2	4	22,82	10,64	0,921	8,352	9,273
3	6	27,86	10,01	1,985	7,307	9,292
4	8	24,22	10,01	2,072	7,007	9,079
5	11	22,96	8,68	3,082	5,364	8,446
6	14	19,32	8,33	3,723	4,123	7,846
7	17	20,58	7,84	4,524	3,261	7,785
8	21	22,26	9,45	5,580	2,863	8,443
9	30	17,92	15,19	6,272	2,643	8,915

Azote, en g.



Graphique XII.

Variation de l'azote protidique des radicelles N_r , de l'azote protidique des malts N_m et de l'azote protidique total N_T au cours de la germination de l'Orge.

substances dissoutes par l'alcool et l'éther, lors de la préparation de la matière première (voir II^e partie, chap. III) et qui ne sont pas de nature alcaloïdique; peut-être se retrouve-t-il, pour une autre partie, dans l'eau du milieu de culture.

Nous faisons remarquer l'énorme disproportion existant entre l'azote sous forme protidique et l'azote sous forme alcaloïdique. Les quantités d'azote sous forme d'hordénine et de tyrosine sont, au contraire, beaucoup plus comparables :

Si nous prenons en effet le stade n° 5, nous voyons qu'il s'y trouve 8,446 g d'N protidique, représentant environ $8,446 \times 6,14 = 51,85$ g de matière protidique; contre 0,0239 g d'N alcaloïdique représenté par 282 mg d'hordénine, et 0,339 g d'N sous forme de tyrosine (4,39 g).

$$\text{Ainsi, le rapport } \frac{\text{N hordénine}}{\text{N protides}} = 0,283 \%$$

$$\text{tandis que le rapport } \frac{\text{N hordénine}}{\text{N tyrosine}} = 7,02 \%$$

Dans les seules radicules, à ce même stade n° 5, nous trouvons :

3,082 g N protidique;

0,0239 g N de l'hordénine (282 mg)

et 0,0925 g N de la tyrosine (1,196 g)

$$\text{et l'on a comme rapport } \frac{\text{N hordénine}}{\text{N protides}} = 0,77 \%$$

$$\text{et } \frac{\text{N hordénine}}{\text{N tyrosine}} = 25,83 \%$$

$$\text{le rapport } \frac{\text{N tyrosine}}{\text{N protides}} = 3,00 \%$$

Le tableau XXXVI montre la répartition de l'azote des *radicules* sous les trois formes : protides, tyrosine, hordénine et leurs rapports mutuels au cours de la germination.

Nous y voyons :

1° Que le rapport $\frac{\text{N tyrosine}}{\text{N protides}}$ augmente, malgré quel-

ques irrégularités au cours de la germination.

TABLEAU XXXVI

*Répartition de l'azote des radicelles sous trois formes : protides, tyrosine, hordénine
et leurs rapports mutuels au cours de la germination de l'Orge.*

Stade.	Age.	N protides. grammes	N tyrosine. grammes	N hordénine. grammes	$R = \frac{N \text{ tyrosine.}}{N \text{ protides.}}$	$R' = \frac{N \text{ hordénine.}}{N \text{ protides.}}$	$R'' = \frac{N \text{ hordénine.}}{N \text{ tyrosine.}}$
1	2	0,273	0,0068	0,00064	2,49	0,23	9,41
2	4	0,921	0,0271	0,0101	2,94	1,09	37,26
3	6	1,985	0,0518	0,0162	2,60	0,81	31,27
4	8	2,072	0,0590	0,0166	2,84	0,80	28,13
5	11	3,082	0,0925	0,0239	3,00	0,77	25,83
6	14	3,723	0,1335	0,0233	3,58	0,62	17,45
7	17	4,524	0,1530	0,0232	3,38	0,51	15,16
8	21	5,580	0,1811	0,0127	3,24	0,22	7,01
9	30	6,272	0,2715	—	4,32	—	—

2° Que le rapport $\frac{N \text{ hordénine}}{N \text{ protides}}$, montre comme le rapport $\frac{\text{Hordénine}}{\text{Matière sèche}}$, un maximum dès le 4^e jour, puis baisse régulièrement pour s'annuler après 30 jours.

3° Le rapport $\frac{N \text{ hordénine}}{N \text{ tyrosine}}$ présente également un maximum le 4^e jour, puis s'abaisse ensuite. La valeur absolue que peut atteindre ce rapport : 37 %, montre qu'à certains stades, l'azote sous forme d'hordénine est loin d'avoir une valeur négligeable par rapport à celui sous forme de tyrosine. Ce point autorise par conséquent le rapprochement que nous avons fait de ces deux substances.

Pour la même raison, les comparaisons entre l'azote alcaloïdique et l'azote protidique telles qu'elles ont été faites par un grand nombre d'auteurs n'ont aucun sens.

Ajoutons que la microchimie nous montrant que, dans une radicelle, la localisation de l'hordénine est très limitée, ceci prouve qu'à l'endroit précis où elle se trouve, l'hordénine représente une quantité d'azote très importante par rapport à celle sous toutes les autres formes. Si l'on remarque que cette localisation se fait précisément dans un tissu en voie de multiplication très intense, on conçoit l'importance du problème soulevé.

CHAPITRE VI

EXPÉRIENCES TENDANT A INFLUER SUR LA FORMATION DE L'HORDÉNINE

Les résultats analytiques obtenus au cours de la germination de l'Orge vivant aux dépens de ses seules réserves ne nous ayant pas permis de tirer de conclusion définitive sur les relations entre l'hordénine et la tyrosine, nous avons pensé tout d'abord qu'en modifiant les milieux jusqu'ici uniquement composés d'eau nous pourrions atteindre le but visé.

A. — GERMINATIONS EN MILIEU MODIFIÉ

1^{re} EXPÉRIENCE.

Nous ajoutons à une germination de 0 kg 200, 0,50 g de tyrosine tandis qu'une opération comparative est menée parallèlement, sans tyrosine. L'arrêt de la germination est effectué après 4 jours 1/2; nous effectuons un dosage d'hordénine dans les radicelles :

TABLEAU XXXVII

Nature de l'Orge.	Quantité.	Tyrosine ajoutée.	Durée germination.	Poids radicelles.	Rendement en radicelles.	Malt.	Hordénine.
	kg	g	j	g	‰	g	
Orge chevalier..	0,200		4,5	5,61	28,0	188	absence
Orge chevalier..	0,200	0,500	4,5	5,48	27,4	184	absence

Nous remarquons tout d'abord que dans cette expérience les rendements en poids de radicelles sont identiques, que l'on ait ou non ajouté de la tyrosine au milieu.

En second lieu, le rendement de 28 ‰ est très inférieur à celui obtenu lors des germinations précédentes du même

échantillon d'Orge Chevalier (environ 45 ‰). Toutes les conditions de germination sont identiques sauf la saison : novembre au lieu de juillet.

On constate aussi que les graines ayant trempé dans la solution de tyrosine deviennent plus foncées que celles du témoin, le noircissement ayant lieu surtout à l'extrémité de la graine opposée à la sortie des radicules. L'aspect des radicules n'est guère différent dans les deux cas.

L'analyse chimique ne nous révèle d'hordénine ni dans l'une ni dans l'autre germination. L'examen microchimique est très faiblement positif.

N'ayant disposé pour l'analyse que de faibles quantités de matières premières et l'expérience présentant dans son ensemble un caractère aberrant, nous en réalisons une seconde du même type.

2^e EXPÉRIENCE.

0 kg 500 du même Orge est mis à germer en présence de 1 g de tyrosine et 0 kg 500 sans tyrosine. Arrêt après 7 jours de germination.

Les résultats sont indiqués dans le tableau XXXVIII :

TABLEAU XXXVIII

Nature de l'Orge.	Quantité.	Tyrosine ajoutée.	Durée germination.	Poids radicules.	Rendement en radicules.	Malt.	Hordénine,	Concentration d'hordénine.
	kg	g	j	g	‰	g	mg	‰
Orge chevalier.	0,500	...	7	17,50	35,0	371	9,8	0,56
Orge chevalier.	0,500	1	7	14,15	28,3	380	11,8	0,83

On voit ici que le rendement en germes, environ 31 ‰, est encore très inférieur à celui des germinations de juillet, lesquelles, pour une même durée, présentent un rendement de 80 ‰. Cette germination, commencée au début de décembre, est donc du même type que la précédente. Par contre, l'hordénine est décelable, quoique en très faible quantité. Le lot auquel a été ajoutée la tyrosine renferme une quantité d'hordénine assez nettement supérieure : 0,83 ‰ au lieu de

0,56 ‰. Ces teneurs sont très inférieures à celles de juillet pour la même durée de germination (1,90 ‰).

3^e EXPÉRIENCE.

Nous demandant si le vieillissement de notre échantillon d'Orge Chevalier n'est pas la cause de ces différences, nous faisons une troisième expérience sur un échantillon d'Orge de Colmar, spécial pour malterie. La germination porte sur deux prises d'essai de 0 kg. 500 d'Orge, 1 g de tyrosine étant ajouté à l'une d'elles. La germination, d'une durée de six jours, est commencée fin janvier.

TABLEAU XXXIX

Nature de l'Orge.	Quantité.	Tyrosine ajoutée.	Durée germination.	Poids radicelles.	Rendement en radicelles.	Malt.	Hordénine.	Concentration d'hordénine.
	kg	g	j	g	‰	g	mg	‰
Orge de Colmar	0,500	...	6	13,1	26,2	390	8,1	0,62
Orge de Colmar	0,500	1	6	16,7	33,4	386	10,2	0,61

Ici encore, le rendement en radicelles est faible : 30 ‰ en moyenne, au lieu de 70 ‰. La qualité de l'Orge est donc hors de cause : qu'il s'agisse d'Orge Chevalier ou d'Orge de Colmar, les germinations s'effectuent dans les mêmes conditions. Cependant, à l'inverse de ce que l'on constate dans la 2^e expérience, le rendement en poids de touraillons secs est légèrement plus élevé en présence de tyrosine (33,4 ‰ au lieu de 26,2 ‰). Les teneurs en hordénine sont par contre très voisines et toujours très basses : 0,62 et 0,61 ‰.

4^e EXPÉRIENCE.

Les trois expériences précédentes n'ayant donné que peu de résultats, nous reprenons un quatrième essai, fin mars, pour élucider la question des bas rendements trouvés pendant tout l'hiver, bien que les conditions de température (+ 16° C.) et d'humidité (atmosphère saturée) soient les mêmes qu'en été, lors des premières germinations. Une

petite modification apportée dans les trois expériences précédentes ayant été la substitution de l'eau distillée à l'eau de chaux pour effectuer la première trempe, dans quelle mesure cette substitution agit-elle, l'eau distillée renfermant des traces de cuivre provenant de l'appareil utilisé pour sa préparation?

En dehors de ce point, nous examinons si la tyramine, dont on doit théoriquement prévoir la formation au moins transitoire (si la réaction hypothétique dont nous sommes parti a réellement lieu dans la nature) a une influence. Enfin, l'hordénine elle-même est ajoutée à l'une des prises d'essai.

Six lots de 1 kg d'Orge de Colmar sont mis à germer. La première trempe de 20 heures est effectuée :

Pour le lot *a* : avec de l'eau bidistillée (exempte de cuivre).

— *b* : avec de l'eau distillée (traces de cuivre).

— *c* : avec de l'eau de chaux.

— *d* : —

— *e* : —

— *f* : —

Après une aération de 10 heures, on effectue une seconde trempe de 24 heures :

Pour le lot *a* : avec de l'eau bidistillée.

— *b* : avec de l'eau distillée (ce lot représente l'homologue des témoins de novembre, décembre et janvier).

— *c* : avec de l'eau distillée (analogue au témoin des expériences de juillet).

— *d* : avec une solution de 300 mg de tyrosine dans de l'eau bidistillée.

— *e* : avec une solution de 300 mg de tyramine dans de l'eau bidistillée.

— *f* : avec une solution de 300 mg d'hordénine dans de l'eau bidistillée.

Les arrosages ultérieurs en cours de germination sont conduits pour les lots : *d*, *e*, *f*, de manière à ce que finalement 1 g de chacun des corps ajoutés soit fourni à la germination correspondante.

Les germinations sont arrêtées après 4 jours et demi de germination (non compris le temps des « trempes »). Il est

procédé ensuite aux dosages de l'hordénine, de la tyrosine et de l'azote protidique.

Le tableau XL renferme les données numériques de cette expérience.

Nous constatons :

1^o Que l'expérience *b*, conduite avec l'eau distillée ordinaire fournit un poids de germes plus grand que tous les autres lots, tandis que les teneurs en tyrosine et en azote protidique de ce lot sont les plus faibles;

2^o Les teneurs d'hordénine, d'ailleurs variables d'un lot à l'autre, sont sans rapport avec l'addition dans les cultures de substances telles que la tyrosine, la tyramine ou l'hordénine elle-même;

3^o Les germinations avec tyrosine et avec tyramine noircissent fortement contrairement à celles avec hordénine qui demeurent d'une couleur analogue à celle des lots *a*, *b*, *c*.

Ces expériences où le milieu est modifié par addition de substances supposées génératrices d'hordénine n'apportent donc aucun résultat.

B. — GERMINATION D'EMBRYONS SÉPARÉS

Les expériences précédentes nous montrent toutefois que les réserves protidiques de la graine constituent un réservoir important de tyrosine empêchant d'apprécier les variations que nous espérons provoquer. Dans le but d'éliminer ces réserves, nous tentons la germination d'embryons séparés des graines sur milieu nutritif auquel nous ajoutons de la tyrosine ou de la tyramine, les témoins en étant dépourvus.

Nous excisons les embryons et les débarrassons au maximum de toute portion d'albumen, ce qui, dans l'Orge, est assez aisé. Nous constatons par ailleurs que dans les limites de durée de nos expériences (une semaine environ) la stérilisation du milieu à l'exclusion de celle des embryons suffit à éviter le développement de moisissures.

Le milieu utilisé est celui employé par M. J. GUÉRILLOT (1) pour la culture des végétaux supérieurs, milieu

(1) Renseignement oral de M. J. GUÉRILLOT.

très bien équilibré au point de vue minéral. Nous lui ajoutons 8 % de glucose. En voici la composition :

$(\text{NO}^3)^2\text{Ca}$	1 g	FNa.....	0,001g
PO^4KH^2	0,25	SO^4Na^2	0,100
NO^3K	0,25	I K.....	0,0001
SO^4Mg , 7 H^2O	0,25	Br K.....	0,0003
$(\text{SO}^4)^4\text{Al}^2$, $(\text{NH}^4)^2$, 24 H^2O	0,04	SO^4Ni , 7 H^2O ...	0,0002
$(\text{SO}^4)^4\text{Fe}^2$, $(\text{NH}^4)^2$, 24 H^2O	0,04	SO^4Co , 7 H^2O ...	0,0001
$\text{SO}^4 \text{Mn}$	0,005	$\text{SO}^4 \text{Cu}$, 5 H^2O ..	0,003
$\text{SO}^4 \text{Zn}$, 7 H^2O	0,008	NO^3H	0,03
SiO^3K^2	0,02	Cl Na.....	0,01
$\text{B}^4\text{O}^7\text{Na}^2$, 10 H^2O	0,008		

Eau : q. s. p. 1,000 g.

+ solution CO^3Na^2 à 10 % : q. s. p. pour ajuster au p H. 6,3.

3 séries de tubes de fort diamètre remplis avec 50 cm³ du milieu sont constituées :

1^{re} série : milieu témoin;

2^e série : + 10 mg de tyramine par tube;

3^e série : + 10 mg de tyrosine par tube.

On place à la surface du liquide un tampon de coton hydrophile servant de support aux germes. Les tubes, bouchés avec du coton, sont stérilisés 15 minutes à + 110° C.

On place 5 embryons sur le coton-support de chaque tube et referme avec les précautions bactériologiques. Les tubes sont placés à la température de + 16° C.

Il ne peut être question dans ces expériences de doser l'hordénine des radicelles en raison du très petit nombre de celles-ci. La méthode microchimique que nous avons précisée est utilisée en vue d'une évaluation approximative.

Après 6 jours de germination, on constate :

1° que dans les témoins, la précipitation par les réactifs généraux des alcaloïdes est du même ordre que dans les radicelles normales, quoique un peu plus faible;

2° que les radicelles des 2^e et 3^e séries donnent des précipitations du même ordre d'intensité.

Ainsi s'avère-t-il très difficile d'empêcher l'hordénine d'apparaître dans les radicelles (1^{re} série). D'ailleurs le tableau XXXIV le fait prévoir puisque la tyrosine con-

tenue dans les embryons : 0,414 g, est suffisante pour produire éventuellement 0,192 g d'hordénine après 6 jours de germination.

Cette expérience montre bien la difficulté de dissocier l'ensemble de réactions aboutissant à l'hordénine.

C. — REMARQUES SUR L'ACTION DE LA TYROSINASE

La tyrosinase, enzyme découverte par G. BERTRAND (12) en 1895, transforme en présence d'oxygène la tyrosine en un pigment noir. Cette oxydase, très répandue dans le règne végétal, se trouve en particulier dans les graines et c'est à cela que l'on doit le noircissement constaté dans la germination des expériences précédentes.

D'une manière très constante, nous voyons que toutes les fois que de la tyrosine est ajoutée à une germination d'Orge, il se produit un noircissement généralisé des graines, dès les premières heures; le noircissement est très sensible par comparaison avec la germination-témoin.

En examinant une graine avec attention après 2 ou 3 jours de germination, on constate que les extrémités sont plus foncées que la partie médiane.

Les germinations effectuées en présence de tyramine présentent le même phénomène tandis que celles où l'hordénine est ajoutée conservent la même couleur que les témoins.

Ces observations nous incitent à reproduire *in vitro* ces expériences. La source de tyrosinase est une macération glycinée de *Russula delica*; on obtient :

1° avec une solution à 1 ‰ de tyrosine, une coloration rose passant au rouge, suivie d'un dépôt noir après 24 heures;

2° avec une solution à 1 ‰ de sulfate de tyramine : même phénomène;

3° avec une solution de N-monométhyltyramine (corps préparé par nous et dont il est question dans la 1^{re} partie de ce travail), même coloration rouge avec dépôt ultérieur de mélanine;

4° avec une solution à 1 ‰ de sulfate d'hordénine ou d'hordénine-base, aucune coloration ni dépôt, même après plusieurs jours,

Enfin nous essayons, par comparaison, l'action de la tyrosinase sur des substances voisines de l'hordénine :

5° sur l'adrénaline : coloration rose immédiate devenant orangée après 24 heures;

6° sur l'éphédrine : aucune action apparente.

Déjà LÉGER (89), sur les conseils de BOURQUELOT, avait essayé l'action de la macération glycinée de Russule sur une solution de tartrate neutre d'hordénine à 1 % et il n'avait constaté aucune coloration en présence d'air. L'eau oxygénée, neutralisée par CO_3Ca était également sans action.

Par contre, l'addition simultanée à la solution de tartrate d'hordénine de ferment et d'eau oxygénée neutralisée produisait une coloration rouge après 10 à 15 minutes, coloration demeurant après 48 heures.

Nous ne voulons pas ici passer en revue tous les travaux que la mélanogénèse et la nature des pigments intermédiaires formés dans cette réaction ont suscités. Nous ne citerons que les conclusions générales que l'examen d'un grand nombre de mémoires nous permet d'énoncer en nous limitant à un seul aspect de la question, à savoir le rôle que paraît jouer l'*hydrogène libre lié à l'azote* de la molécule ou, au contraire, la *substitution* de celui-ci par des groupements méthyle par exemple.

Nous revenons ainsi par une observation expérimentale au problème de la méthylation à l'azote qui a retenu notre attention au début de ce travail.

Les recherches de G. BERTRAND (1908) (14) ont précisé le rôle essentiel de l'oxhydrile phénolique dans ces phénomènes d'oxydation.

La nature des produits formés, pigments rouges et mélanines, ont donné lieu à des controverses prolongées. Voici, très résumées les théories en présence :

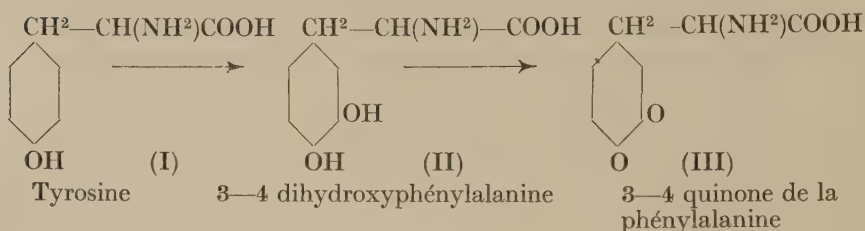
D'après les idées tout d'abord émises par CHODAT et SCHWEIZER (27), au sujet de l'action de la tyrosinase, non sur la tyrosine, mais sur le glycocolle, cette enzyme serait une désaminase. La partie aminée de la molécule jouerait ainsi un rôle de premier plan. BACH (4) reprend cette notion au sujet de

la tyrosine. Le premier stade serait donc un départ d'ammoniaque pouvant être accompagné d'une décarboxylation.

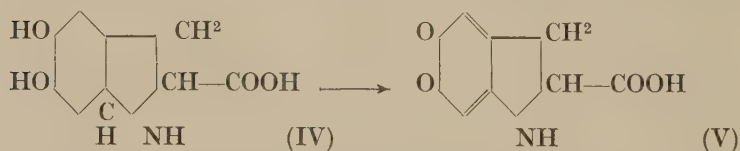
D'autres auteurs, parmi lesquels ONSLOW (100), HAEHN (57, 58) acceptent aussi cette manière de voir.

Cependant, les expériences de CHODAT et SCHWEIZER, où se forment de l'ammoniaque accompagné d'aldéhyde formique dans l'action de la tyrosinase sur le glycocolle, ne peuvent être reproduites par HAPPOLD et RAPER (62). A la suite d'un grand nombre de mémoires renfermant les résultats de nombreuses analyses, RAPER (111) édifie une théorie différente :

La tyrosine serait tout d'abord oxydée dans le noyau de façon à conduire à la 3-4 quinone de la phénylalanine :

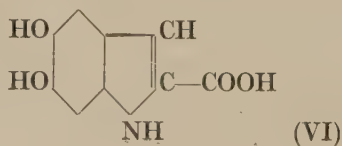


Puis, la formation vérifiée de dérivés indoliques suppose une transposition conduisant à l'acide 5 : 6 dihydroxydihydroindol-2-carboxylique (IV) :

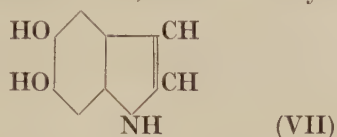


lequel, oxydé ultérieurement, donne la quinone correspondante (V). Cette dernière serait la *substance rouge* visible dans la réaction; ultérieurement cette quinone peut donner naissance :

1° + une trace de SO_4H_2 , à l'acide 5 : 6 dihydroxyindol-carboxylique :



2° Ou lentement, dans le vide, au 5 : 6 dihydroxyindol :



Ces deux derniers corps, oxydés, conduiraient aux mélanines. Quelle que soit l'opinion que l'on puisse avoir du bien-fondé des transformations précédentes, il est intéressant de noter que, dans cette théorie, une *transposition moléculaire* conduit au noyau indolique. En examinant les formules, on voit qu'il est nécessaire que se produise une cyclisation au niveau de l'azote; or celle-ci n'est possible que par la *migration d'un atome d'hydrogène* de l'azote au carbone du noyau situé en *meta* par rapport à la chaîne latérale (formules III et IV). *L'existence d'au moins un atome d'hydrogène lié à l'azote* est donc théoriquement indispensable et nos expériences sont en accord avec cette explication :

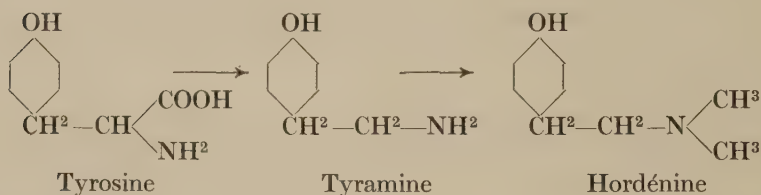
1° La tyramine, où 2 atomes d'hydrogène sont liés à l'azote, donne une coloration rouge (formation du noyau indolique);

2° La N-monométhyltyramine, où demeure un atome d'hydrogène lié à l'azote, donne encore la même réaction;

3° L'hordénine, où les deux atomes d'hydrogène sont substitués par des restes méthyle, n'est plus capable de donner cette coloration rouge. Comme c'est à partir de ce composé rouge que prend naissance la mélanine, on comprend donc que nos germinations en présence d'hordénine restent identiques aux germinations-témoins.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

L'hordénine, alcaloïde des racines d'Orge, encore appelée anhaline en raison de sa présence dans un *Anhalonium*, Cactée du Mexique, présente la formule de la tyrosine décarboxylée et diméthylée à l'azote. De plus, la tyrosine uniquement décarboxylée constitue la tyramine, base naturelle que l'on trouve dans l'Ergot. La parenté des formules de la tyrosine, de la tyramine et de l'hordénine explique, sans le prouver, le schéma que l'on rencontre souvent dans la littérature :



Nous nous sommes proposé de vérifier si une telle *filiation* se présente réellement dans la nature.

Entre l'hypothèse et la recherche biochimique, se présentait tout naturellement une étude intermédiaire, celle des possibilités de ces transformations, *in vitro*, en choisissant des méthodes offrant un maximum de probabilité biologique. L'idée première d'études de cette nature est due à ROBINSON qui l'a énoncée à propos de la synthèse bien connue de la tropinone. Malgré les mérites qu'on lui a reconnu, il faut constater que bien peu de biochimistes s'en inspirèrent par la suite.

La première partie de ce travail renferme donc l'exposé, en suivant ce principe, de la *décarboxylation* expérimentale de la tyrosine, puis de la *méthylation* de la tyramine formée. A côté des cinq ou six synthèses plus ou moins compliquées

que l'on connaît de cet alcaloïde, nous effectuons ainsi une nouvelle préparation synthétique très simple, *réalisable à froid*, à l'aide de l'aldéhyde et de l'acide formiques.

L'hordénine disparaissant des radicelles d'Orge, après un certain temps de germination, nous nous sommes demandé si la *transformation inverse*, hordénine-tyrosine, était possible. La *déméthylation* de l'hordénine par l'intermédiaire de l'aminooxyde de cet alcaloïde, ou génhordénine — composé préparé ici pour la première fois — présente incontestablement un grand intérêt parce qu'elle revient globalement à une réaction exactement inverse de la méthylation formique de la nouvelle synthèse :



Une discussion de ce mécanisme de la méthylation-déméthylation à l'azote termine la partie plus particulièrement chimique de ces recherches.

La vérification biochimique, abordée aussitôt, pose tout d'abord différents problèmes de *technique* qui font l'objet de la deuxième partie :

1° Le *dosage de l'hordénine* est effectué par une méthode personnelle, minutieusement établie, où l'alcaloïde est finalement pesé en nature après purification par distillation dans le vide. Par la technique des quantités ajoutées, est vérifiée la limite de précision du dosage : $\pm 2 \%$;

2° La *tyrosine*, dont l'évaluation directe dans les végétaux n'avait fait jusqu'à présent l'objet d'aucune étude quantitative serrée, est dosée par mesure photo-électrique de l'intensité de la réaction de MILLON.

Grâce à l'étude séparée de chacun des nombreux facteurs pouvant perturber ce dosage, l'erreur dont est entaché le résultat n'excède pas ici $\pm 5 \%$. Même dans le dosage relativement plus simple de la tyrosine dans les matières protidiques isolées, il n'est pas exagéré de dire que les méthodes antérieures comportaient une erreur imprévisible ;

3° Nous précisons ensuite une technique rapide de *dosage de l'azote protidique* ;

4° La *technique microchimique* classique appliquée directement à la recherche de la localisation de l'hordénine ne

donnant pas satisfaction, nous proposons une formule nouvelle du réactif de MAYER. Le nouveau réactif, plus dilué, utilisé en excès, redissout facilement, *in vitro*, l'hordénine et non les matières protidiques végétales. La disparition progressive du précipité alcaloïdique tout d'abord formé, que des photographies successives de la même préparation permettent d'enregistrer, rend indiscutables les résultats d'une telle technique.

L'application des techniques précédentes est étudiée dans la troisième partie :

1^o Les germes de 21 Graminées, une Cactée, et une Amaryllidée font l'objet d'une recherche systématique de l'hordénine, par la méthode chimique jointe à l'examen microchimique précédemment précisé.

Cet alcaloïde est ainsi signalé pour la première fois dans les radicelles d'un Orge sauvage, l'*Hordeum murinum*, Linné, et confirmé dans celles du Millet, *Panicum miliaceum*, Linné. — (L'examen, postérieur à cette dernière recherche, d'un document japonais peu connu, réduit cette constatation faite tout à fait indépendamment à une confirmation).

Dans toutes les autres plantes, en dépit de certaines considérations détaillées dans le mémoire, l'hordénine n'a pu être décelée ;

2^o L'analyse immédiate de l'Orge ne permet pas d'affirmer l'existence de la tyrosine à l'état libre ; ceci est important à souligner, puisque cette substance sert de point de départ dans notre hypothèse. Sa grande labilité dans le complexe protidique rend très vraisemblable son existence transitoire.

Au cours des mêmes recherches, la tyramine n'a pu être identifiée qu'avec peine, et il n'existe certainement pas d'alcaloïdes autres que l'hordénine dans l'Orge ;

3^o L'étude parallèle, au cours de neuf stades échelonnés dans le temps, de l'évolution de l'hordénine, de la tyrosine et de l'azote protidique pendant la germination, précise à la fois, par des évaluations faites en concentration et valeur absolue, le comportement de ces substances et leurs relations mutuelles. Tandis que la quantité de tyrosine totale de l'ensemble graine-plantule baisse au début de la germination

pour passer par un minimum, puis *augmente* sans toutefois reprendre sa valeur initiale, on voit l'hordénine suivre une évolution inverse puisqu'elle apparaît dès les premiers jours, passe par un maximum puis retombe à zéro. La perte en tyrosine n'est pas *quantitativement* balancée par l'apparition de l'alcaloïde, mais ce dernier peut intervenir avec une grande probabilité pour une proportion de 23 %. Cette dernière valeur, relativement élevée, est donc bien plus satisfaisante pour effectuer une comparaison utile que celle du rapport, autrefois utilisé, des azotes protidique et alcaloïdique;

4° Au cours de la *germination en pleine terre*, l'hordénine présente une évolution comparable à celle observée pendant la germination dans les conditions de la malterie.

5° Dans le but de faire apparaître plus nettement la filiation tyrosine-hordénine, nous tentons d'*influer expérimentalement* sur la teneur des radicules en cet alcaloïde.

Les *germinations comparatives* sur eau distillée d'une part, sur solution de tyrosine, de tyramine ou d'hordénine d'autre part, nous permettent une constatation intéressante : nous voyons dans le cas de la tyrosine et de la tyramine un noircissement des cultures, non constaté dans le cas de l'hordénine et qui permet d'éclairer un point particulier de l'action de la tyrosinase.

Les *germinations d'embryons séparés* ne nous apportent pas de résultat intéressant autre que celui, tout négatif, qu'il est fort difficile de dissocier les phases de l'élaboration de l'hordénine.

En résumé, le schéma théorique de filiation, qui nous a servi de point de départ, est possible in vitro, dans des conditions d'allure biologique et la réalisation de ce schéma dans la nature prend, à la suite de nos recherches, un caractère de grande probabilité sinon de certitude.

*
* *

Ainsi, nous sommes amené, en nous plaçant sur un plan plus général, à constater combien nos moyens d'investigation chimique restent grossiers vis-à-vis du problème à résoudre.

Certes, il nous avait bien semblé, dès le début de notre travail, que les expériences basées sur une comparaison

de l'évolution de l'azote protidique et de l'azote alcaloïdique aboutissant à établir un rôle d'engrais, d'aliment ou de réserve *azotés*, partaient d'une appréciation exagérée de l'importance de l'azote dans la molécule de l'alcaloïde.

Nous avons pensé qu'à côté de cet *élément*, et même des autres éléments qui, dans la constitution des alcaloïdes ont évidemment l'importance de *matières premières*, il y a l'*arrangement*, l'*organisation* de ces éléments entre eux. C'est donc surtout à la recherche de l'existence réelle d'une filiation de corps de *configuration voisine* que nous nous sommes appliqué dans ce travail.

Pour nous, les notions d'alcaloïde, substance de réserve, ou substance de déchet, dans la mesure où l'on entend réserve ou déchet *azoté* n'ont guère de sens. Par contre, l'alcaloïde, substance de réserve d'un certain type de noyau, ou même voie d'élimination de ce même noyau nous semble plus vraisemblable.

Cependant, nous voyons que les comparaisons restent difficiles. Une des raisons de cette difficulté nous paraît être la suivante : nos résultats analytiques, malgré nos efforts dans ce sens, ne sont pas rapportés à un élément de comparaison convenable. Prenons un exemple : nous donnons, dans notre travail, tous les éléments numériques qui permettent de connaître la quantité absolue d'hordénine et de tyrosine d'une radicule ; ce n'est pas suffisant. L'hordénine est localisée dans *une petite* partie de la radicule, tandis que la tyrosine est répartie dans *toute* cette radicule. Que tirerons-nous de la comparaison de ces chiffres ? Peu de chose, car la transformation peut avoir lieu, *in situ*. Il faudrait connaître la teneur en tyrosine des cellules où est localisée l'hordénine. On voit la difficulté. Ce n'en est qu'une et il s'en pose de ce genre à chaque instant. Il faudrait pouvoir faire de la chimie à l'échelle de la cellule vivante ; la méthode microchimique, réduite à quelques réactions de coloration et de précipitation, est encore loin de compte.

Quittant le domaine de ces considérations techniques pour revenir à la *manière* d'aborder ces problèmes de filiation biologique, nous ne regrettons pas d'avoir intercalé entre

l'hypothèse et l'examen biologique une étude inspirée des « modèles de phyto-synthèse » de ROBINSON et nous croyons que des études analogues rendront de grands services dans la résolution d'autres questions.

Enfin, il est une notion du rôle de l'alcaloïde sur laquelle il nous paraît intéressant de revenir pour terminer. C'est celle du rôle *hormonal* de ces substances imaginé par G. CIAMICIAN et C. RAVENNA (30). M. Michel POLONOVSKI écrit à ce sujet : « L'importance de ces substances (les hormones) pour le maintien de l'équilibre qui doit présider à la vie et au fonctionnement harmonique de tous les organes, semble s'affirmer de plus en plus avec le progrès des recherches. Combien plus important encore pourrait être le rôle dévolu à de semblables substances chez les plantes qui sont complètement dépourvues de système d'innervation et chez lesquelles seuls les phénomènes humoraux peuvent suppléer à cette absence d'organes spécialisés. Ce sont les phénomènes chimiques qui doivent déterminer tous les actes de la vie de la plante, déclencher la floraison, la maturation et tous les autres événements importants. »

Nous ferons remarquer à ce sujet que des phénomènes aussi universels dans le monde végétal que ceux invoqués par M. M. POLONOVSKI devraient être provoqués par des substances non moins universellement répandues. Or, nous savons que ce n'est pas le cas des alcaloïdes, malgré la parenté de certains d'entre eux avec quelques hormones (remarquons à ce sujet que l'hordénine est proche de l'adrénaline et de la thyroxine).

La transposition des hormones du règne animal dans le règne végétal n'en est pas moins féconde puisque l'on connaît des substances qualifiées du nom d' « hormones de croissance » qui, à des doses incroyablement petites, ont une action essentielle sur l'élongation ou la multiplication cellulaires. Lorsque l'on voit l' « hétéro-auxine » ou acide indol-acétique par exemple, si proche du tryptophane et de certains alcaloïdes à noyau indolique, il est impossible de ne pas être frappé par ces analogies de constitution qui permettent d'orienter les recherches sur le rôle éventuel de toutes ces substances organiques complexes.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. ABDERHALDEN (E.) et ROSSNER (E.). — Weitere Studien ueber die Lichtabsorption im Ultraviolett durch α -Aminosaeuren, Polypeptide, 2,5-Dioxopiperazine und Betaine. *Zschr. f. physiol. Chemie*, **178**, 156, 1928.
2. ABELIN (J.). — Beitrage zur Kenntnis der physiologischen Wirkung der proteinogenen Amine. VI. Mitteilung, Vegetatives Nervensystem und spezifisch-dynamische Wirkung. *Biochem. Zschr.*, **137**, 273, 1923.
3. ADLER (L.). — Untersuchungen zur Pharmakologie der Gefaesse. *Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmacol*, **91**, 81, 1921.
4. BACH (A.), cité par RAPER (H. S.). — Ergebnisse der Enzymforschung, I. Band 1932.
5. BAEHR (G.) et PICK (E. P.). — Ueber den Angriffspunkt der Blutdruckwirkung der Phenolbasen. *Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmacol*, **80**, 161, 1916-17.
6. BAEYER. — Brevet D. R. P. Kl. 12 q N° 233.069. *Chem. Centralblatt*, 1911. I, 1263.
7. BARDAN. — Recherches sur les amines du groupe de la benzyldiamine, Thèse Doctorat Sciences, Paris, 1928.
8. BARGER (G.). — Isolation and synthesis of *p*-hydroxyphenylethylamine, an active principle of ergot soluble in water. *Journ. Chem. Soc. London*, **95**, 1123, 1909. Synthesis of hordenin, the alkaloid from barley. *Même revue*, **95**, 2193, 1909.
9. BARGER (G.) et DALE (H. H.). — Chemical structure and sympathomimetic action of amines. *Journ. of Physiol*, **41**, 34, 1910.
10. BEATTIE (F. S.). — Abnormal biochemical products of the rue anemone. *Amer. Chem. Journ.*, **40**, 415, 1908.
11. BERTHELOT (M.) et JUNGFLEISCH (E.). — Sur les lois qui président au partage d'un corps entre deux dissolvants. *C. R. Ac. Sc.*, **69**, 338, 1869.
12. BERTRAND (G.). — Sur une nouvelle oxydase, ou ferment soluble oxydant, d'origine végétale. *C. R. Ac. Sc.*, **122**, 1215, 1896.

13. BERTRAND (G.). — Sur l'emploi de l'acide silicotungstique comme réactif des alcaloïdes. *Bull. Soc. Chim.*, 21, 434, 1899.
14. BERTRAND (G.). — Recherches sur la mélanogénèse : action de la tyrosinase sur divers corps voisins de la tyrosine. *Bull. Soc. Chim.*, 3, 335, 1908 et *Annales Inst. Pasteur*, 22, 381, 1908.
15. BLARINGHEM (L.). — L'amélioration des crûs d'Orges, Paris, 1910.
16. BLAU (H.). — Eine Beitrag sur Kenntniss des Surinamins. *Zschr. f. physiol. Chemie*, 58, 153, 1908.
17. BOINET. — Du touraillon d'Orge en thérapeutique. *Marseille Médical*, 38, 673, 1901.
18. BORSCOW. — Beitrage zur Histochemie der Pflanzen. *Botan. Zeit.*, 32, 17 et 33, 1874.
19. BOTTAZZI (Ph.). — Recherches sur la glande salivaire postérieure de l'*Octopus macropus*. *Arch. internat. de Physiol.*, 18, 313, 1921.
20. BOURGEOIS (L.). — Recherches sur les bromures d'ammonium quaternaires dérivés de la benzhydrylamine. Thèse Doctorat de l'Université de Paris (Pharmacie), 1924.
21. BRAUN (J. v.). — Synthese und pharmakologische Wirkungen des Hordenins. *Chemiker Zeitg.*, 36, 1098, 1912.
22. BRY (G.). — Ueber die respirationser regende Wirkung von Phenylaethylaminderivaten. *Zschr. f. exper. Pathol. u. Therapie*, 16, 186, 1914.
23. CAMBIER (R.) et BROCHET (A.). — Action de l'aldéhyde formique sur les amines et leurs sels. *Bull. Soc. Chim.*, 13, 392, 1895 et *C. R. Ac. Sc.*, 120, 449, 1895.
24. CAMBIER (R.) et BROCHET (A.). — Préparation de la monométhylamine. *Bull. Soc. Chim.*, 13, 533, 1895.
25. CAMUS (L.). — L'hordénine, son degré de toxicité, symptômes de l'intoxication. *C. R. Ac. Sc.*, 142, 110, 1906.
Action du sulfate d'hordénine sur la circulation. *C. R. Ac. Sc.*, 142, 237, 1906.
Action du sulfate d'hordénine sur les ferments solubles et sur les microbes. *C. R. Ac. Sc.*, 142, 350, 1906 et *Arch. internat. Pharmacodyn. et Thérapie*, 16, 43, 1906.
26. CHAZE (J.). — Contribution à l'étude biologique des alcaloïdes du tabac. Thèse Sciences naturelles, Paris, 1931.
27. CHODAT (R.) et SCHWEIZER (K.). — Nouvelles recherches sur les ferments oxydants. La tyrosinase est aussi une désaminase. *Arch. Sc. Phys. et Nat.*, Genève, 35, 140, 1913.

28. CIAMICIAN (G.) et RAVENNA (C.). — Recherche sur la genèse des alcaloïdes dans les plantes. *Annales Chimie et Physique*, 25, 404, 1912.
29. CIAMICIAN (G.) et RAVENNA (C.). — *Gazzetta chimica*, 48-I, 265, 1918; 49-II, 84, 1919; 49-II, 101, 1919.
30. CIAMICIAN (G.) et RAVENNA (C.). — Sur la signification biologique des alcaloïdes chez les plantes, traduit librement par R. CERRIGHELLI. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 5, 59, 1923.
31. CLAUTRIAU. — L'azote dans les capsules de Pavot. *Bull. Soc. belge de Microscopie*, 18, 83, 1892.
32. CLAUTRIAU, cité par A. GORIS. — Localisation et rôle des alcaloïdes, Paris, 1914, p. 210.
33. DENIGÈS (G.). — *Bull. Travaux Soc. Pharm. Bordeaux*, 3, 104 et 786, 1908.
34. DIELS (O.) et FRITZSCHE (P.). — Zur Kenntnis der Azodicarbonsäureester. *Ber.*, 44, 3018, 1911 et FISCHER (E.), Ueber N-Demethylkodein. *Ber.*, 47, 2043, 1914.
35. DUNSTAN. — *Journ. Amer. trans.*, 18, 716, 1887.
36. EHRLICH (E.). — Ueber die Vergärung des Tyrosins zu *p*-Oxyphenyläthylalkohol (Tyrosol). *Ber.*, 44, 139, 1911.
37. EHRLICH (F.) et PISTSCHIMUKA (P.). — Synthesen des Tyrosols und seine Umwandlungen in Hordenin. *Ber.*, 45, 2428, 1912.
38. EICHHOLTZ (F.). — Ueber den Einfluss von Nikotin u. nikotinartig wirkenden Substanzen auf die Adrenalinsekretion. *Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol.*, 99, 172, 1923.
39. ERRERA, MAISTRIAU et CLAUTRIAU. — Premières recherches sur la localisation et la signification des alcaloïdes dans les plantes. *Bull. Soc. belge de Microscopie*, 12, 5, 1885-86. — Réimprimé : *Recueil Inst. bot. Errera*, 2, 147, 1906.
40. ESCHWEILER. — Brevet allemand 80.520, 1893.
41. ESCHWEILER et KOEPPEN (A.). — Ueber die Darstellung von Trimethylamin durch Methylierung von Ammoniak mit Hülfe von Formaldehyd. *Ber.*, 38, 882, 1905.
42. EWIN (A.) et LAIDLAW. — The fate of parahydroxyphenylethylamine in the organism. *Journ. of Physiol.*, 41, 78, 1910.
43. FABRE (C.). — Sur les propriétés bactéricides et les applications thérapeutiques des touraillons d'Orge. *Bull. Ac. Sciences et Belles Lettres de Toulouse*, 2, 292, 1899.
44. FOLIN (O.) et CIOCALTEU (V.). — On tyrosin and tryptophane determination in proteins. *Journ. of Biol. Chemistry*, 73, 627, 1927.

45. FOLIN (O.) et DENIS (W.). — Tyrosin in proteins as determined by a new colorimetric method. *Journ. of Biol. Chemistry*, **12**, 245, 1912.
On the tyrosin content of proteins. A reply to Abderhalden and Fuchs. Mème revue, **14**, 457, 1913.
46. FOLIN (O.) et LOONEY (J. M.). — Colorimetric methods for the separate determination of tyrosin, tryptophane, and cystine in proteins. *Journ. of Biol. Chemistry*, **51**, 421, 1922.
47. FOLIN (O.) et MARENZI (A. D.). — Tyrosin and tryptophane determination in one-tenth gram of protein. *Journ. of Biol. Chemistry*, **83**, 89, 1929.
48. GAEBEL (O.). — Ueber das Hordenin. *Archiv der Pharmazie*, **244**, 435, 1906.
49. GADAMER (J.). — Formation des alcaloïdes. Importance biologique. *Ber. Pharm. Ges.*, **24**, 35, 1914.
50. GADREAU (M.). — Contribution à l'étude des ferrocyanhydrates d'alcaloïdes et à leurs applications analytiques. *J. P. C.*, **6**, 145, 1927 et Thèse Doctorat Université Paris (Pharmacie), 1927.
51. GAUTIER (A.). — Sur les tyrosamines. *Bull. Soc. Chim.*, **35**, 1195, 1906.
52. GIBBS, cité par J. GUÉRIN. — Thèse Dipl. Pharm. Sup., Paris, 1932, p. 14.
53. GORIS (A.). — Localisation et rôle des alcaloïdes et des glucosides chez les végétaux. Paris, 1914.
54. GUÉRIN (J.). — Contribution à l'étude du dosage colorimétrique de la tyrosine et du tryptophane dans les matières protéiques. *J. P. C.*, **17**, 237, 1933, et Thèse Dipl. Pharm. Sup. Paris, 1932.
55. GUGGENHEIM. — Les amines biologiques. Édition française par BERTHELOT (A. R.), PRÉVOT et KARL (O.), Baillière éditeur, Paris, 1934, p. 8 et 345.
56. GUIOTH (J.). — Sur une méthode de préparation d'amines tertiaires diméthylées à l'azote. Thèse Doctorat Université Paris (Pharmacie), 1922.
57. HAEHN (H.). — Die Zerlegung der Kartoffeltyrosinase in Komponenten. *Ber.*, **52**, 2029, 1929.
58. HAEHN (H.). — Die Zerlegung der Tyrosinase in Komponenten. *Biochem. Zschr.*, **105**, 169, 1920.
59. HAMET (R.). — Ueber die nikotinartige Wirkung des Hordenins. *Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol.*, **158**, 187, 1930.
60. HAMET (R.). — Sur l'action hypotensive et vasodilatatrice de l'hordénine. *C. R. Soc. Biol.*, **114**, 476, 1933.

61. HAMET (R.). — Sur une propriété physiologique encore inconnue de l'hordénine. *C. R. Soc. Biol.*, **121**, 112, 1936.
62. HAPPOLD (F. C.) et RAPER (H. S.). — The tyrosinase-tyrosine reaction. The supposed desaminising action of tyrosinase on amino-acids. *Biochem. Journ.*, **19**, 92, 1925.
63. HECKEL (E.). — Sur l'utilisation et la transformation de quelques alcaloïdes dans la graine pendant la germination. *C. R. Ac. Sc.*, **110**, 88, 1890.
64. HEFFTER (A.). — Ueber zwei Cacteenalkaloide. *Ber.*, **27**, 2975, 1894.
65. HEFFTER (A.). — Ueber Cacteenalkaloide. II. *Mitteilung. Ber.*, **29**, 216, 1896; III. Id., **31**, 1194, 1898; IV. Id., **34**, 3004, 1901.
66. HENZE (M.). — Ueber den Tyramin-und Tyrosingehalt der Speicheldrüse der Cephalopoden; zugleich Methodisches zur Mikrobestimmung der beiden Substanzen. *Zschr. f. physiol. Chem.*, **182**, 227, 1929.
67. HENRY. — *Bull. Ac. Roy. Belgique*, **26**, 200, 1893, et **28**, 355, 1894.
68. HESS (K.). — Zur Synthese des Hygrins. I. *Ber.*, **46**, 3113, 1913; II. Synthese des racemischen Hygrins. Eine neue Oxydationsmethode. Weitere Mitteilungen ueber die katalytische Hydrierung von Pyrrolderivaten. *Ber.*, **46**, 4104, 1913.
69. HESS (K.). — Ueber die Alkaloide des Granatapfelbaumes. I. Ueber das Pelletierin. *Ber.*, **50**, 368, 1917.
70. HESS (K.) et EICHEL (A.). — Ueber die Alkaloide des Granatapfelbaumes. II. Ein Trennungsgang fuer die Reindarstellung der Pelletierin-Alkaloide. Aufklaerung der Konstitution des Methylisopelletierins (Methyl-pelletierin, Isomethyl-pelletierin). Umwandlung des Conhydrins in Methyl-isopelletierin. Die Konstitution des Conhydrins. *Ber.*, **50**, 1386, 1917.
71. HESS (K.) et LEIBBRANDT (F.). — Synthese von N-Methyl-tetrahydropyridin-carbonsäuren. Eine neue Bildungsweise des Arecaidins und des Arecolins. Zur Aufklaerung der Konstitutionen des Guvacins und des Arecains. *Ber.*, **51**, 806, 1918.
72. HILGER, cité par KIPPENBERGER (C.), Grundlagen fuer den Nachweis von Giftstoffen. Berlin, 1897.
73. HOUSSAY (B. A.) et MOLINELLI (E. A.). — Adrenal secretion produced by asphyxia. *Amer. Journ. of. Physiol.*, **76**, 538, 1926.
Effect of nicotin, cystosin, lobelin, coniin, piperidin and quaternary ammonias on adrenal secretion. *Même revue*, **76**, 551, 1926.

74. JACKSON (D. E.). — The action of certain drugs on the bronchioles. *Journ. of Pharmacol. and exper. therap.*, 5, 491, 504, 1914.
75. JANOT (M.) et FAUDEMAY (P.). — Silicotungstate cristallisé d'hordénine. Dosage de l'hordénine. *Bull. Sciences pharmacol.*, 39, 288, 1932.
76. JEANTET (R.). — Contribution à l'étude des nitriles phénylacétiques α monoalcoylés. Thèse Doctorat Sciences, Paris, 1927.
77. JOHNSON (B.) et GUEST (H.). — Resarches on amines : synthesis of methylphenylethylamine. *American Chem. Journ.*, 42, 340, 1909.
78. KAYSER (E.). — Contribution à l'étude des malts de brasserie. *Annales Inst. Pasteur*, 484, 1890.
79. KINDLER (K.). — Studien ueber den Mechanismus chemischer Reaktionen. Erste Abhandlung. Reduktion von Amidén und Oxydation von Aminén. *Liebigs Ann.*, 431, 187, 1923 et *Bull. Soc. Chim.*, 34, 1214, 1923.
80. KINDLER (K.). — Ueber neue und ueber verbesserte Wege zum Aufbau von pharmakologisch wichtigen Aminén. *Arch. der Pharm.*, 265, 389, 1927 et *Bull. Soc. Chim.*, 42, 1448, 1927.
81. KOLOTOW. — *Journ. chim. russe*, 1^{re} série, 1885, p. 229.
82. LABAT (A.). — Réaction de l'hordénine et de l'urotropine. *J. P. C.*, 29, 433, 1909.
83. LADENBURG (A.). — Die Constitution des Tropins. *Ber.*, 20, 1647, 1887.
84. LÉGER (E.). — Sur l'hordénine, alcaloïde nouveau retiré des germes, dits touraillons, de l'Orge. *J. P. C.*, 23, 177, 1906.
85. LÉGER (E.). — Sur la constitution de l'hordénine. *C. R. Ac. Sc.*, 143, 234 et 916, 1906.
Sur l'hordénine, alcaloïde nouveau retiré des germes, dits touraillons, de l'Orge. *C. R. Ac. Sc.*, 142, 108, 1906.
Sur quelques dérivés de l'hordénine. *C. R. Ac. Sc.*, 144, 208, 1907.
86. LÉGER (E.). — Sur la constitution de l'hordénine. *C. R. Ac. Sc.*, 144, 488, 1907.
Sur l'hordénine, alcaloïde nouveau retiré des germes, dits touraillons, de l'Orge. *J. P. C.*, 23, 177, 1906.
Sur quelques dérivés de l'hordénine. *J. P. C.*, 25, 273, 1907.
Sur la constitution de l'hordénine. *Bull. Soc. Chim.*, 35, 868, 1906 et 1, 148, 1907.
87. LÉGER (E.). — A propos de la synthèse de l'hordénine. *Bull. Soc. Chim.*, 7, 172, 1910.

88. LÉGER (E.). — *Bull. Soc. Chim.*, 35, 1157, 1906.
89. LÉGER (E.). — Sur quelques dérivés de l'hordénine. *J. P. C.*, 25, 273, 1907.
90. LERMER (J. C.). — *Dingler's Polyt.*, 1865, p. 71.
91. LEWIN (L.). — Ueber Anhalonium Lewinii. *Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmacol.*, 24, 401, 1888. Ueber Anhalonium Lewinii und andere Cacteen. Même revue, 34, 374, 1894.
92. LEWIS (J.-T.) et LUDUENA (F.). — Sur l'action de l'extrait de *Trichocereus candicans* Br. et Rose et de ses principes actifs, l'hordénine ou anhaline, et les sels de *p*-oxyphényléthyltriméthylammonium, sur la sécrétion d'adrénaline. *C. R. Soc. Biol.*, 114, 814, 1933.
93. LUDUENA (F.). — Action pharmacodynamique d'un extrait de *Trichocereus candicans* Br. et Rose. *C. R. Soc. Biol.*, 114, 809, 1933.
94. Mac FARLANE (W. O.) et FULMER (E. L.). — The colorimetric determination of the tyrosine and tryptophane content of various crude protein concentrates. *Biochem. Journ.*, 24, 1601, 1930.
95. MEISENHEIMER (J.). — Ueber Pyridin-, Chinolin- und Isochinolin-N-oxyd. *Ber.*, 159, 1848, 1926.
96. MESROBIAN (I.). — Contribution à l'étude de la méthylation des amines par l'aldéhyde formique. Thèse Doctorat Université (Pharmacie) Paris, 1932.
97. MEUNIER (P.). — Recherches analytiques sur l'aluminium des tissus animaux. Thèse Sciences. Paris, 1936.
98. MOLINELLI (E. A.). — La secrecion de adrenalina. Tesis med. Buenos-Aires, 1926, p. 220-242.
99. NIEDFELD (H. A.). — Tesis del profesorado suplente, Rosario, 1931.
100. ONSLOW (M. W.). — Oxidising enzymes. A note on tyrosinase. *Biochem. Journ.*, 17, 216, 1923.
101. OTTO, cité par OGIER (J.) et KOHN-ABREST (E.). — *Chimie toxicologique*, 1924, t. II, 95.
102. OSBORN. — The vegetable proteins. Londres, 1909.
103. PICO (O. M.). — Action des digitaliques sur le cœur isolé de *Leptodactylus ocellatus*. *C. R. Soc. Biol.*, 87, 568, 1922.
104. PICTET (A.) et COURT (G.). — Ueber einige neue Pflanzenalkaloide. *Ber.*, 40, 3771, 1907.
105. PICTET (A.) et SPENGLER (Th.). — Ueber die Bildung von

- Isocholin-derivaten durch Einwirkung von Methylal auf Phenyl-aethylamin, Phenylalanin und Tyrosin. *Ber.*, **44**, 2030, 1911.
106. POLONOVSKI (Max et Michel). — Sur les aminoxydes des alcaloïdes. *Bull. Soc. Chim.*, **39**, 1147, 1926.
107. POLONOVSKI (Max et Michel). — Sur les aminoxydes des alcaloïdes. III. Action des anhydrides et chlorures d'acides organiques. Préparation des bases nor. *Bull. Soc. Chim.*, **41**, 1190, 1927.
108. POLONOVSKI (Max et Michel). — Sur les aminoxydes des alcaloïdes du groupe du tropane. *C. R. Ac. Sc.*, **180**, 1755, 1925.
109. POLONOVSKI (M.) et LESPAGNOL (A.). — Éléments de chimie organique biologique, Masson et C^{ie} éditeurs, Paris, 1934.
110. PSCHORR (R.), WOLFES (O.) et BUCKOW (W.). — Synthetische Versuche in der Phenanthrenreihe. Synthese von (1) -und (3) -Methoxyphenanthren. *Ber.*, **33**, 162, 1900.
111. RAPER (H. S.). — Tyrosinase. Ergebnisse der Enzymforschung, I. Band, 1932.
112. RETI (L.). — Sur les alcaloïdes de la Cactacée *Trichocereus candicans* Br. et Rose. *C. R. Soc. Biol.*, **114**, 811, 1933.
113. REILHES (R.). — Sur la localisation de l'hordénine dans les plantules d'Orge. *C. R. Soc. Biol.*, **122**, 852, 1936.
114. ROBINSON (R.). — A synthesis of tropinone. *Journ. Chem. Soc. London*, **111**, 762, 1917.
115. ROBINSON (R.). — A theory of the mechanism of the phytochemical synthesis of certain alkaloids. *Journ. Chem. Soc. London*, **111**, 876, 1917.
116. ROBINSON (R.). — *Proc. Univ. Durham, Phil. Soc.*, **8**, part I, 14, 1927-28.
117. ROSENMUND (K. W.). — Die Synthese des Hordenins, eines Alkaloids aus Gerstenkeimen, und ueber (α)-p-Oxyphenyläethylamin. *Ber.*, **43**, 306, 1910.
118. ROUHIER (A.). — Le Peyotl la plante qui fait les yeux émerveillés. Thèse Doctorat Université (Pharmacie), Paris, 1926.
119. ROUX (G.). — Société Médicale de Lyon. *Lyon Médical*, **64**, 475, 1890.
120. SABRAZÈS (J.) et GUÉRIVE (G.). — Valeur thérapeutique du sulfate d'hordénine. *C. R. Ac. Sc.*, **147**, 1076, 1908.
121. SCHULZE (E.). — Einige Bemerkungen zu den Arbeiten ueber den Naehrwert der in den Pflanzen enthaltenen Amide. *Zschr. f. Physiol. Chem.*, **57**, 67, 1908.

122. SEKA. — Handbuch der Pflanzenanalyse. Klein, III, IV-I, 503, 1933.
123. SPAETH (E.). — Ueber die Anhalonium-Alkaloide. I. Anhalin und Mezcalin. *Monatsh. f. Chem.*, **40**, 129, 1919; Id. III. Konstitution des Anhalins. *Même revue*, **42**, 263, 1921.
124. SPAETH (E.). — Ueber die Anhalonium-Alkaloide. V. Die Synthese des Anhalonidins und des Pellotins. *Monatsh. f. Chem.*, **43**, 477, 1922.
125. SPAETH (E.) et ROEDER (H.). — Ueber die Anhalonium-Alkaloide. III. Die Synthese des Anhalamins. *Monatsh. f. Chem.*, **43**, 93, 1922.
126. SPAETH (E.) et PASSL (J.). — Ueber die Konstitution von Pellotin und Anhalonidin. *Ber.* **65**, 1778, 1932.
127. SPAETH (E.) et SOBEL (Ph.). — Neue Synthesen des Hordenins. *Monatsh. f. Chem.*, **41**, 77, 1920.
128. STUTZER (A.). — *Journ. f. Landw.*, **28**, 103.
129. TABONE (J.). — Application de l'électrodialyse à la recherche toxicologique. Thèse Doctorat Université (Pharmacie), Paris, 1936.
130. TANRET (G.). — Sur l'action hyperglycémiant du sulfate d'hordénine. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **15**, 11, 1933.
131. THOMAS (P.). — Sur le dosage du tryptophane dans les matières protéiques. *Annales Inst. Pasteur*, **34**, 701, 1920.
132. THOMAS (P.). — *Manuel de biochimie*, Masson, Paris, 1936, p. 920.
133. TILLMANS (J.), HIRSCH (P.) et STOPPEL (F.). — Ein neues Verfahren zur Bestimmung von Tryptophan und Tyrosin in Proteinen durch die quantitative Ausgestaltung der Xanthoproteinreaktion... (et applications). *Biochem. Zschr.*, **198**, 379, 1928.
134. TORQUATI (Torquato). — Recherches sur la formation de l'hordénine pendant la germination des semences d'Orge. *Archivio Farmacol. sperim. e Scienze affini*, **10-2**, 62, 1910.
135. ULLMANN (A.). — Ueber Tyramin (p-Oxyphenylaethylamin) als wirksamen Bestandteil der Droge *Semina cardui Mariae* (Stechdistelkoerner). *Biochem. Zschr.*, **128**, 402, 1922.
136. VOSWINCKEL (H.). — Ueber eine neue Synthese des Hordenins. *Ber.*, **45**, 1004, 1912.
137. WEEWERS (Th.). — Concerning the function of caffen in the metabolism of *Paullinia cupana*. *Proc. Koning. Ak. V. Wet. t. Amst.*, **29**, 1926.
138. WELLISCH (J.). — Ueber synthetische Alkaloide aus Tyrosin, Tryptophan und Histidin. *Biochem. Zschr.*, **49**, 173, 1913.

139. WERNER (E. A.). — Methylation by means of formaldehyde. I. The mechanism of the interaction of formaldehyde and ammonium chloride. The preparation of methylamine and of Dimethylamine. *Journ. Chem. Soc. London*, **111**, 844, 1917.
140. WILLSTAETTER (R.). — Ueber das Tropinon. *Ber.* **29**, 393, 1896.
141. WILLSTAETTER (R.). — Ueber die Constitution des Spaltungsprodukte von Atropine und Cocain. *Ber.*, **31**, 1534, 1898.
142. WILLSTAETTER (R.) et IGLAUER (F.). — Ueber die Einwirkung von unterchloriger Saeure auf tertiaere Amine. *Ber.*, **33**, 1636, 1900.
143. WINTERSTEIN (E.). — Ueber die Konstitution des Surinamins. *Zschr. f. Physiol. Chem.*, **105**, 20, 1919.
144. WINTERSTEIN et TRIER. — Die Alkaloide. Berlin, 1931, p. 116 et 870.
145. Yoshitaka HASHITANI. — On the chemical constituents of malt-roodlets with special reference to hordenine. *Journ. of the College of Agricult. Hokkaido imp. University*, **14**, 1, 1924.
146. ZUWERKALOW (D.). — Zur Frage der Tyrosin bestimmung mit Hilfe der Millonschen Reaktion. *Zeitschr. für Physiol Chemie*, **163**, 185, 1927.
-

DEUXIÈME THÈSE

La perméabilité cellulaire chez les végétaux.

Vu et approuvé :

Paris, le 20 Novembre 1936

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

CH. MAURAIN

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY.

Imp. Oberthur, Rennes-Paris (1902-11-36).

